

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**Mestrado em Ciências Forenses**

**GENOTIPAGEM DO GENE NOS1AP E RISCO  
CARDIVASCULAR - ESTUDO DE UMA POPULAÇÃO DO  
NORTE DE PORTUGAL**

**Daniel Filipe Conceição Sousa**

**Orientação:**

**Professora Doutora Laura Cainé**

(Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. e  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

**Coorientação:**

**Mestre Benedita Silva**

(Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.)

**Professor Doutor Agostinho Santos**

(Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. e  
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)



**Setembro 2017**

Genotipagem do gene NOS1AP e risco cardiovascular. Estudo de uma população do Norte de Portugal.

**DANIEL FILIPE CONCEIÇÃO SOUSA**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Forenses



**Setembro 2017**

Trabalho realizado no Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação do  
Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

# Agradecimentos

Em primeira instância quero agradecer à Professora Doutora Laura Cainé, orientadora deste projeto, à Mestre Benedita Silva e ao Professor Doutor Agostinho Santos, coorientadores neste projeto, não só pela competência científica e acompanhamento, mas também pela valiosa ajuda no apoio bibliográfico. Agradeço ainda a disponibilidade e generosidade reveladas ao longo do período de trabalho, assim como todas as críticas, correções e sugestões essenciais para a conclusão do estudo.

Na realização da presente dissertação, foi também fundamental o apoio direto da Professora Doutora Márian de Pancorbo, a quem muito agradeço pela forma como me recebeu, pelos ensinamentos, pela sua disponibilidade e pelo seu incentivo na elaboração deste trabalho.

Quero também agradecer ao Serviço de Biologia e Genética Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP, em especial à Mestre Gabriela Lima e ao Centro de Investigación Lascaray Ikergunea pela disponibilidade do espaço e aparelhos cedidos para a realização deste projeto.

Deixo também o meu agradecimento a todos os voluntários que aceitaram fazer parte deste estudo e à Professora Doutora Margarida Fonseca pelo auxílio prestado na análise estatística.

Não podia deixar de agradecer aos meus amigos pela amizade, apoio prestado e convivência diária e pelo entusiasmo, seriedade, empenhamento e sentimento de querer sempre “mais e melhor” que sempre me transmitiram.

À minha família que me apoia e pelo orgulho que sempre demonstraram em mim.

*"All truths are easy to understand once they are discovered; the point is to discover them. "*

**Galileu Galilei**

# Resumo

As patologias cardiovasculares são, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a principal causa de morte em Portugal e no resto do Mundo. Embora estas patologias sejam mais comuns em indivíduos mais velhos e com história familiar, os jovens que praticam desporto são um grupo de risco importante de canalopatias cardiovasculares, uma vez que o exercício físico intenso pode, de forma maioritariamente assintomática, acelerar a doença cardiovascular ou ser o desencadeador da mesma, resultando, muitas vezes, em Morte Súbita Cardíaca (MSC).

Em Portugal, a monitorização destas canalopatias cardíacas assume uma grande importância e impacto, não só na comunidade desportiva, mas também na comunidade em geral. Esta importância é devida aos cerca de 1100 casos de MSC em jovens adultos desportistas que se verificaram nos últimos 50 anos em Portugal e à grande mediatização que estes casos têm nos meios de comunicação social.

As canalopatias cardíacas constituem um grupo de doenças hereditárias arritmogénicas, tais como a Síndrome do QT Longo (SQTL), a Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC), a Síndrome de Brugada (SB) e a Síndrome de QT Curto (SQTC) e causam disfunções elétricas isoladas devido a alterações genéticas que codificam as subunidades dos canais iónicos cardíacos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) perpetrando taquiarritmias e síncope que podem rapidamente culminar em MSC.

Perante o grande impacto na saúde pública destas canalopatias torna-se fundamental difundir estratégias de prevenção, principalmente através do reforço de investimento na identificação de marcadores que permitam avaliar e prever com a máxima antecedência a propensão para a ocorrência destes eventos potencialmente fatais.

O gene NOS1AP, localizado no cromossoma 1 humano, encontra-se ligado à função cardíaca. A variabilidade na sua expressão e respetivos polimorfismos estão associados com a incidência da SQTL, sendo por isso fundamental avaliar os principais polimorfismos deste gene de forma a concluir acerca da sua utilidade como marcador genético desta canalopatia.

Neste trabalho será dada especial atenção à SQTL, associada ao potencial do gene NOS1AP ser um marcador efetivo desta doença na prevenção de MSC.

# Abstract

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular pathologies are the most common cause of death in Portugal and in the rest of the world. Although these are more common in older individuals with family pathological background, young people who practice sports are an important risk group for cardiovascular pathologies, since intense physical exercise can, in a mostly asymptomatic way, accelerate or trigger the cardiovascular disease, which often results in Sudden Cardiac Death (SCD).

In Portugal, the monitoring of these cardiac channelopathies has a great importance and impact not only in the sports community but also in the general population. This importance is due to the approximately 110 cases of SCD in young sportsmen that have occurred in the last 50 years in Portugal and to the great mediatization that these cases often have in the media.

Cardiac channelopathies constitute a group of inherited arrhythmogenic diseases such as Long QT Syndrome (LQTS), Polymorphic Ventricular Tachycardia (PVT), Brugada Syndrome (BS), and Short QT Syndrome (SQTS), and cause isolated electrical dysfunctions due to genetic alterations that encode the channel subunits ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), causing tachyarrhythmias and syncope that can rapidly culminate in SCDs.

Facing the great impact of these pathologies on the public health, it is essential to disseminate prevention strategies, mainly through the reinforcement of investment on the identification of markers that could allow the evaluation and maximum prediction of the likelihood of occurrence of these potentially fatal events.

The NOS1AP gene is located on the human chromosome 1 and is mostly linked to cardiac function. The variability on its expression and its polymorphisms are associated with the incidence of LQTS, and it is therefore fundamental to evaluate the main polymorphisms of this gene in order to conclude about its usefulness as a genetic marker of this channelopathy.

In this work, special attention will be given to SQTL, associated with the potential of NOS1AP gene to be an effective marker of this pathology in the prevention of SCD.

# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>i</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>x</b>
<b>1. Justificação e objetivos do estudo .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Introdução .....</b>	<b>4</b>
2.1. Morte Súbita Cardíaca (MSC) .....	4
2.1.1. Definição de MSC e atualidade .....	4
2.1.2. Canalopatias e MSC .....	5
2.2. O gene NOS1AP .....	7
2.2.1. Associação entre diferentes SNP no gene NOS1AP e QTc .....	7
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>11</b>
3.1. Colheita das Amostras .....	11
3.2. Extração das Amostras .....	12
3.3. Amplificação do DNA .....	13



3.4. Purificação dos produtos da PCR .....	15
3.5. Sequenciação do DNA .....	16
3.6. Análise dos resultados .....	17
<b>4. Resultados.....</b>	<b>19</b>
4.1. Caracterização da amostra total examinada .....	19
4.2. Procedimento laboratorial .....	23
4.2.1. Polimorfismo rs10494366 .....	24
4.2.2. Polimorfismo rs10918594 .....	29
4.2.3. Polimorfismo rs12143842 .....	34
4.2.4. Polimorfismo rs16847548 .....	39
4.3. Análise conjunta dos Polimorfismos estudados .....	44
<b>5. Discussão.....</b>	<b>50</b>
5.1. Procedimento laboratorial inicial.....	50
5.2. Análise dos genótipos estudados.....	51
5.2.1. Polimorfismo rs10494366 .....	52
5.2.2. Polimorfismo rs10918594 .....	54
5.2.3. Polimorfismo rs12143842 .....	56
5.2.4. Polimorfismo rs16847548 .....	58

5.3. Análise dos polimorfismos e categorização do risco de apresentar SQT.....	59
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>62</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>70</b>

# Índice de Tabelas

<b>Tabela I.</b> <i>Primers</i> utilizados na investigação.....	14
<b>Tabela II.</b> Componentes da reação de PCR.....	14
<b>Tabela III.</b> Condições para a reação de PCR.....	15
<b>Tabela IV.</b> Condições para o tratamento com <i>ExoSAP-IT</i> .....	16
<b>Tabela V.</b> Componentes da reação de sequenciação.....	16
<b>Tabela VI.</b> Frequências das amostras.....	20
<b>Tabela VII.</b> Caracterização da amostra analisada ( número de indivíduos em estudo (N), média, mediana, moda, desvio padrão, variância, intervalo, amplitude e erro padrão da média).....	22
<b>Tabela VIII.</b> Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs10494366.....	24
<b>Tabela IX.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366.....	26
<b>Tabela X.</b> Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs10918594.....	29
<b>Tabela XI.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594.....	31
<b>Tabela XII.</b> Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs12143842.....	34
<b>Tabela XIII.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs12143842.....	36

<b>Tabela XIV.</b> Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs16847548.....	39
<b>Tabela XV.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548.....	41
<b>Tabela XVI.</b> Resultados obtidos de todas as sequenciações e aplicação do sistema de pontuação criado para a distinção dos voluntários.....	44
<b>Tabela XVII.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).....	53
<b>Tabela XVIII.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).....	55
<b>Tabela XIX.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs12143842, comparando os resultados do presente estudo com o estudo realizado na Suécia (2017).....	57
<b>Tabela XX.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo dos EUA (2016).....	59


# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distribuição da amostra total pelos concelhos de proveniência dos voluntários aquando da entrada no estudo.....	19
<b>Figura 2.</b> Distribuição da amostra total por género.....	20
<b>Figura 3.</b> Distribuição da amostra total pelas idades e género dos voluntários.....	21
<b>Figura 4.</b> Eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) da PCR <i>singleplex</i> utilizada para as regiões-alvo amplificadas.....	23
<b>Figura 5.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366.....	27
<b>Figura 6.</b> Sequência obtida para o SNP rs10494366 com o genótipo GG.....	27
<b>Figura 7.</b> Sequência obtida para o SNP rs10494366 com o genótipo TG.....	28
<b>Figura 8.</b> Sequência obtida para o SNP rs10494366 com o genótipo TT.....	28
<b>Figura 9.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594.....	32
<b>Figura 10.</b> Sequência obtida para o SNP rs10918594 com o genótipo GG.....	32
<b>Figura 11.</b> Sequência obtida para o SNP rs10918594 com o genótipo CG.....	33
<b>Figura 12.</b> Sequência obtida para o SNP rs10918594 com o genótipo CC.....	33
<b>Figura 13.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs12143842.....	37
<b>Figura 14.</b> Sequência obtida para o SNP rs12143842 com o genótipo CC.....	37
<b>Figura 15.</b> Sequência obtida para o SNP rs12143842 com o genótipo CT.....	38

<b>Figura 16.</b> Sequência obtida para o SNP rs12143842 com o genótipo TT.....	38
<b>Figura 17.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548.....	42
<b>Figura 18.</b> Sequência obtida para o SNP rs16847548 com o genótipo TT.....	42
<b>Figura 19.</b> Sequência obtida para o SNP rs16847548 com o genótipo TC.....	43
<b>Figura 20.</b> Sequência obtida para o SNP rs16847548 com o genótipo CC.....	43
<b>Figura 21.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).....	53
<b>Figura 22.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).....	55
<b>Figura 23.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo realizado na Suécia (2017).....	57
<b>Figura 24.</b> Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo dos EUA (2016).....	59
<b>Figura 25.</b> Distribuição da amostra total pelas idades dos voluntários aquando da entrada no estudo.....	70
<b>Figura 26a.</b> Eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) da PCR <i>singleplex</i> utilizada para as regiões-alvo amplificadas - I.....	70
<b>Figura 26b.</b> Eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) da PCR <i>singleplex</i> utilizada para as regiões-alvo amplificadas - II.....	71
<b>Figura 27.</b> Alinhamento das sequências obtidas para o polimorfismo rs10494366 no programa <i>SeqScape Software V3.0</i> .....	72

<b>Figura 28.</b> Alinhamento das sequências obtidas para o polimorfismo rs10918594 no programa <i>SeqScape Software V3.0</i> .....	73
<b>Figura 29.</b> Alinhamento das sequências obtidas para o polimorfismo rs12143842 no programa <i>SeqScape Software V3.0</i> .....	74
<b>Figura 30.</b> Alinhamento das sequências obtidas para o polimorfismo rs16847548 no programa <i>SeqScape Software V3.0</i> .....	75
<b>Figura 31.</b> Modelo de consentimento informado, esclarecido e livre para a inclusão de indivíduos no presente estudo.....	76

# **1. Justificação e Objetivos do Estudo**





Um dos aspetos de maior impacto na população portuguesa, particularmente na comunidade desportiva, para a sensibilização da importância de monitorização de eventos e patologias cardiovasculares nos atletas, reside na divulgação de informação sobre o risco de morte súbita de causa cardíaca (MSC) associada com a prática desportiva. Isto, deve-se aos 1101 casos de MSC que se verificaram em Portugal de 1966 a 2004, em atletas com menos de 40 anos de idade. Cerca de 80% dos jovens adultos atletas, cuja causa de morte se deveu a MSC, foram totalmente assintomáticos para uma doença cardíaca até ao momento da sua morte [3,16,38].

Estes casos de MSC foram significativamente associados com a SQTL, no entanto, em Portugal existe uma ausência quase total de dados e estudos referentes a esta canalopatia, associada com o estudo genético destes indivíduos.

Deste modo, este trabalho é justificado pela necessidade de avaliação do gene NOS1AP poder constituir um marcador efetivo desta doença e consequentemente na prevenção de MSC.

Os objetivos deste trabalho foram:

- Comparar os valores obtidos no estudo com os valores de referência para a população caucasiana europeia, por forma a aferir sobre a possibilidade de extrapolação dos valores obtidos para os expectados na população estudada.
- Analisar o potencial do gene NOS1AP ser utilizado como marcador de presença de SQTL.
- Aperfeiçoar o conhecimento epidemiológico e mapeamento estatístico dos polimorfismos selecionados em jovens adultos de ambos os sexos, residentes no Norte de Portugal, na faixa etária dos 18-40 anos e ligados à prática de desporto.

## 2. Introdução



## 2.1. Morte Súbita Cardíaca (MSC)

### 2.1.1. Definição de MSC e atualidade

A Morte Súbita Cardíaca (MSC) pode ser definida como a morte instantânea ou ocorrida durante as primeiras 24 horas, desde o aparecimento dos sintomas cardíacos, em indivíduos assintomáticos, e sem que tenha ocorrido uma outra explicação que justifique o óbito do indivíduo (homicídio, suicídio, acidente, traumatismo, doença, etc.) [1-4,6,7].

É nos indivíduos idosos que será expectável encontrar o maior número de casos de MSC justificados, sendo que, normalmente a MSC ocorre nesta faixa etária pela ação de doença arterial coronária (DAC). Nos indivíduos entre 1 e 39 anos de idade, a investigação da causa da morte pode ser mais complexa e o exame completo *post mortem* pode não revelar uma causa de morte em cerca de 30% dos casos [8].

A MSC com cerca de um milhão de casos anuais, é uma das mais importantes causas de morte nos países desenvolvidos. No entanto, as ciências da saúde não têm atribuído a este problema a atenção necessária [1]. Embora seja habitual atribuir a maioria das mortes causadas por problemas cardíacos a indivíduos de uma faixa etária avançada, todos os anos ocorrem nesses países cerca de 25000 mortes nos adultos jovens (< 40 anos) devido a diversas patologias cardíacas [2].

Em Portugal, a situação é semelhante ao resto dos países desenvolvidos, sendo a morte por patologias cardiovasculares a principal causa de morte, associada no ano de 2013 a 29,5% do número de óbitos totais. [3].

Nos últimos 15 anos, as análises genéticas tornaram-se numa nova e importante ferramenta para a cardiologia, uma vez que, estas podem ser o único meio para diagnosticar uma doença potencialmente fatal. Nesse âmbito, nos últimos anos foram realizados inúmeros estudos que relacionam diversos genes com estas canalopatias cardíacas [5].

Perante o grande impacto económico e social que os eventos fatais e as patologias cardiovasculares têm na saúde pública, torna-se fundamental promover orientações estratégicas de prevenção na população portuguesa, que contribuam de forma a auxiliar na diminuição da mortalidade relacionada com patologias cardiovasculares. Para além da adoção de estilos de vida e alimentação saudáveis

[1], a identificação de novos marcadores genéticos, que culminem numa antecipação da identificação de eventos cardiovasculares é fundamental na redução da mortalidade.

## **2.1.2. Canalopatias e MSC**

No jovem adulto desportista o grande impacto da MSC durante a prática desportiva, fazem com que essa morte adquira rapidamente uma grande mediatização e preocupação, tanto da comunidade desportiva, como da população em geral.

A atividade física regular traduz-se numa enorme variedade de benefícios para a saúde do praticante, no entanto, é fundamental, como medida de ação e prevenção de mortes nos jovens adultos desportistas, discutir e avaliar o risco de MSC em função da informação genética de cada praticante.

Nestes indivíduos, a Genética Molecular tem vindo a demonstrar que uma fração importante dos casos de MSC encontra-se fortemente associada a alterações elétricas, resultantes de mutações genéticas relacionadas com a codificação de várias proteínas de diferentes canais iónicos, que causam diversas canalopatias cardíacas tais como: Síndrome de QT Longo (SQTL), Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC), Síndrome de Brugada (SB) e Síndrome de QT Curto (SQTC) [2,4-8].

A cada ciclo de despolarização e repolarização cardíaca são produzidas ondas tipicamente detetáveis num eletrocardiograma (ECG) e que traduzem todos os eventos eletrofisiológicos que têm lugar no início de um impulso cardíaco e na sua condução pelo coração. Entre estas, destacam-se a onda P, que corresponde ao evento eletrofisiológico de despolarização auricular (contração), o complexo QRS, que corresponde à despolarização ventricular (contração) e a onda T, que corresponde à repolarização ventricular (relaxamento) [9,10]. O intervalo QT (QTc) corresponde a outro evento eletrofisiológico importante, sendo medido desde o início da onda Q até ao fim da onda T. O seu valor representa a sístole ventricular e resulta da soma da despolarização e da repolarização ventriculares, variando na forma inversa com a frequência cardíaca. Em 2009, a Associação Cardiologia Americana (AHA)

recomendou, para o cálculo do QTc, a utilização da fórmula:  $QTc = QT \text{ medido} + 1,75 \times (\text{Frequência cardíaca} - 60) \text{ (ms)}$ , sendo os valores normais de mínimo 350ms e máximo 440ms (~ 8-11mm no eletrocardiograma) [17].

A SQTL é uma canalopatia cardíaca maioritariamente causada por anomalias na repolarização ventricular relacionadas com o canal de potássio e sódio, onde ocorre um prolongamento QTc para valores acima dos 440 ms e/ou alterações na morfologia específica da onda T, entre elas a *torsades de pointes*. Estas anomalias, são causadas por mutações em genes que codificam as proteínas de membrana cardíaca. As referidas mutações são resultado de pequenas deleções, inserções, duplicações, mas tratam-se, essencialmente, de mutações *missense*. [9,10,17].

São conhecidas duas etiologias de SQTL: a *adquirida*, induzida pela utilização de fármacos como a amiodarona, fenotiazinas, quinidina, procainamida, antidepressivos tricíclicos, entre outros ou por distúrbios metabólicos, nutricionais ou lesões do sistema nervoso central; e a *congénita*, que se divide em dois tipos, a forma congénita dominante ou Síndrome de Romano-Ward, a mais comum e responsável por cerca de 99% dos casos, apresentando um fenótipo puramente cardíaco, e a forma congénita recessiva ou Síndrome de Jervell e Lange-Nielsen, claramente residual e associada com surdez neuro-sensorial [5,11].

Esta canalopatia cardíaca congénita é hereditária e apresenta uma prevalência aproximada de cerca de um caso a cada 3000 pessoas [28,29], sendo que os indivíduos portadores desta patologia podem, ao longo da sua vida, sofrer episódios clínicos de palpitações, síncope e convulsões ou permanecerem totalmente assintomáticos. A importância desta canalopatia reside no facto do prolongamento da repolarização implicar um aumento na duração do potencial de ação. Este aumento pode ter implicações quando o indivíduo portador da patologia, esteja a desenvolver uma atividade física intensa ou exposto a situações de *stress* e até mesmo em repouso, ou seja, podem ser despoletadas taquiarritmias ventriculares polimórficas do tipo *torsades de pointes* ou síncope, que podem gerar fibrilhações ventriculares e culminar em episódios de paragem cardíaca e morte [12-15].

## 2.2. O gene NOS1AP

### 2.2.1. Associação entre diferentes SNP no gene NOS1AP e QTc

O gene óxido nítrico sintase 1 adaptador de proteína (NOS1AP) encontra-se situado entre a posição 162069791-162370023 (GRCh38.p2) no cromossoma 1 humano. É um regulador da sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) que codifica proteínas citosólicas que estão associadas a doenças neurológicas e que ajustam os níveis intracelulares de cálcio, sódio e potássio e as contrações dos miócitos do coração [18-21], encontrando-se, deste modo, largamente ligado à função cardíaca, sendo mesmo o *locus* que possui a maior contribuição na variabilidade na repolarização cardíaca individual [20-24].

Estudos recentes, postulam que variações no gene NOS1AP estão associadas com a incidência de SQTl em indivíduos saudáveis, quando estes apresentam algumas variantes do gene [18,22,25]. Embora ainda exista desconhecimento sobre a função bioquímica do gene NOS1AP no tecido cardíaco [18,26-29], as variações interindividuais na sequência do gene estão associadas a um aumento de aproximadamente 30% do risco de morte súbita de causa cardíaca na população geral [28-31] e são um fator de suscetibilidade para a ocorrência de taquiarritmias cardíacas [22].

Os polimorfismos genéticos são variantes no genoma dos genótipos normais [30]. O tipo mais comum de polimorfismo, corresponde a substituições de um único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP), correspondendo a 90% do total de polimorfismos genéticos, sendo estes também os marcadores de eleição na análise populacional com base em DNA nuclear [30-35].

Os SNP são variações individuais num local particular do genoma que ocorrem em média um vez a cada 300 nucleótidos, tendo o alelo menos repetido uma frequência igual ou superior a 1% [30]. Os SNP podem estar presentes nas sequências codificantes dos genes, nas regiões não codificantes ou nas regiões intergénicas.

O estudo de SNP exige a aplicação de técnicas céleres, específicas, e reprodutíveis, que permitam a análise de um elevado número de amostras em simultâneo. Estes marcadores têm como características:

- A génese de produtos amplificados menores que 100 pb, adequados a serem marcadores em casos de amostras degradadas;
- A possibilidade de serem utilizados em *multiplex*;
- O facto de não produzirem *stutters*, uma vez que a variação não envolve sequências repetitivas.

Todas estas características conferem aos SNP, atualmente, um interesse muito alargado por parte da comunidade forense [30-37].

No entanto, como cada SNP só apresenta dois alelos possíveis, para que lhe possa ser conferido um poder de discriminação aceitável é necessária a análise de um número muito elevado de marcadores deste tipo. Assim, os SNP não serão tão eficazes como os *Short Tandem Repeats* (STR), na identificação genética individual, sendo o uso simultâneo destes marcadores uma melhor opção [32].

A análise do genoma tem consistentemente associado variantes do gene NOS1AP com o QTc. O NOS1AP interage com a nNOS de forma a acelerar a repolarização cardíaca por inibição dos canais de cálcio tipo L, justificando a associação do gene com o QTc [18,41]. Os polimorfismos rs10494366, rs12143842, rs10918594 e rs16847548 são SNP, que, de acordo com diversos estudos, são os que mais significativamente se encontram associados com o aumento do QTc e, por esse motivo, demonstram o maior potencial de aplicação [19,24,27-29,38].

Na presença de um alelo G ( $\rightarrow$  TG) o SNP rs10494366 está associado com um aumento de 3,8 ms (IC: 3,0 – 4,6 ms,  $p=7,8 \times 10^{-20}$ ) do QTc e na presença de dois alelos G ( $\rightarrow$  GG) o valor do aumento do QTc multiplica em média por 2,5 [19,25,39,52].

O SNP rs10918594 associa-se a um maior valor de QTc, em 3,6 ms (IC: 2,7 – 4,4 ms,  $p=6,9 \times 10^{-17}$ ) para indivíduos com um alelo G ( $\rightarrow$  CG) e com o triplo do aumento no valor QTc normal em indivíduos com dois alelos G ( $\rightarrow$  GG) [25,39,52].

O SNP rs12143842 na presença de um alelo T ( $\rightarrow$  CT) é responsável pelo maior prolongamento QTc, com um valor de 4,4 ms (IC: 3,6 – 5,2 ms,  $p=4,4 \times 10^{-28}$ ) e para o dobro do aumento do QTc, quando apresenta dois alelos T ( $\rightarrow$  TT) [40].

O quarto SNP, rs16847548, induz um aumento de 8,0 ms (IC: 7,0 – 9,0 ms,  $p=9,0 \times 10^{-3}$ ) [24] na presença de um alelo C ( $\rightarrow$  TC), sendo esse aumento superior em 160% na presença de dois alelos C ( $\rightarrow$  CC) [22,24,27].



### **3. Materiais e Métodos**



Na execução do presente estudo foi utilizado um conjunto de amostras de material biológico proveniente de 50 indivíduos voluntários, residentes no Norte de Portugal, praticantes de pelo menos uma atividade física e pertencentes à faixa etária dos 18 aos 40 anos.

Para cada um dos voluntários participantes neste estudo foi preenchido um questionário inicial onde se compendiam os seguintes dados: nome do responsável pela colheita; número de referência da amostra; género; idade; local de residência; data e hora da colheita; atividade desportiva praticada; presença ou ausência de antecedentes cardiovasculares e história familiar. De forma a preservar a identidade dos indivíduos, todos os dados, incluindo nome, estado civil e filiação não foram anexados no presente estudo.

Posteriormente, a análise ao material colhido foi executada no laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forenses da Delegação Norte (SGBF-N) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF, IP), aplicando um protocolo adaptado do SGBF-N. Em todas as etapas de execução do estudo foram utilizadas bata, máscara e luvas de proteção.

### **3.1. Colheita das amostras**

A primeira parte da execução deste estudo focou-se na colheita das amostras biológicas que serviram de base para a execução de todo o estudo. Esta etapa foi efetuada nos concelhos de Vila Nova de Gaia, Porto, Gondomar, Maia, Matosinhos, Valongo e Guimarães, durante o período de 15/02/2017 a 25/02/2017, após consentimento informado do estudo (observável na figura 31), em indivíduos com prática regular de pelo menos uma atividade desportiva.

A população feminina foi composta por 7 indivíduos com idades entre os 24 e os 38 anos (idade média de 30,43 anos). O conjunto masculino foi constituído por 43 indivíduos, com idades compreendidas entre os 18 e os 40 anos (idade média de 24,72 anos).

Após identificação do voluntário foi colhida com o auxílio de uma zaragatoa bucal *Sterile OmniSwab* (Whatman®), uma amostra de células epiteliais da cavidade

oral. Para o efeito cada um dos lados da zaragatoa foi friccionado na parte interna da cavidade oral.

Cada amostra foi identificada com o número de referência da amostra.

Posteriormente, cada amostra foi seca e acondicionada à temperatura ambiente, em local protegido, e depois transportada para o laboratório de modo a seguir com o procedimento laboratorial previsto.

## 3.2. Extração das amostras

Para a realização do procedimento de extração de DNA das amostras colhidas foi utilizado o método de extração com *kit Prep-n-Go™* (Applied Biosystems®), específico para extrações em saliva, seguindo as condições descritas no protocolo do SGBF-N. Para tal, foi cortada uma secção da zaragatoa para um tubo de 1,5 mL, a qual foi adicionada 200 µL de água ultrapura *DNAse free water* (Qiagen®), com 200 µL do *kit Prep-n-Go™* (Applied Biosystems®). Posteriormente cada tubo foi colocado no termobloco *QBD1* (Grant®) durante 20 min, à temperatura de 90°C.

De acordo com as instruções do fabricante, este *kit* contém na sua constituição partículas com uma composição química otimizada, de forma a obter ácidos nucleicos de qualidade, especialmente em amostras de saliva, aumentando o rendimento global da extração, assim como a concentração de ácidos nucleicos extraídos das amostras e permitindo também a remoção dos inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR), o que se traduz na produção de maiores quantidades de ácidos nucleicos altamente purificados, melhorando o procedimento laboratorial posterior.

Todos os procedimentos de extração foram realizados numa sala dedicada à extração e incluíram um controlo negativo, efetuado com água ultrapura *DNAse free water* (Qiagen®). O DNA extraído foi posteriormente armazenado a -20°C.

### 3.3. Amplificação do DNA

A amplificação de sequências específicas de DNA foi efectuada pelo método de reacção em cadeia da polimerase, *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Face à inexistência de *primers* específicos para as regiões em que se objetivava amplificar, foi necessário proceder ao desenho dos mesmos e à avaliação da viabilidade das respetivas temperaturas de *melting*, ao tamanho do produto amplificado e à exclusão da produção de dímeros entre cadeias e *hairpins* (estrutura em *loop* formada por bases nucleotídicas emparelhadas erradamente, que se assemelha a dímero mas que se formam dentro da própria cadeia de DNA), o que foi conseguido através da aplicação dos *softwares* *PearlPrimer*, *Primer-Blast* e *AutoDimer*. O desenho dos *primers* necessários para a investigação, foi efetuado no laboratório do Centro de Investigación Lascaray Ikergunea, sob a orientação da Professora Doutora Márian de Pancorbo.

Para tal foram descarregadas as sequências da região-alvo do Genbank no formato FASTA e arquivo de texto, com 800pb e com *locus* a analisar no meio da sequência descarregada; as sequências foram depois importadas para programa *PearlPrimer*; as potenciais regiões para o desenho do par de *primers* de cada sequência foram depois analisadas pelo programa *PearlPrimer* e seleccionando-se três alternativas para cada par de *primer* a utilizar, realizando um ajuste na temperatura de *melting* para que se aproximem, dentro de um intervalo curto; de seguida, no programa *Primer-Blast* testaram-se os vários *primers* seleccionados, observando-se não só a temperatura de *melting* idênticas (mínimo 57°C, máximo 63°C e ótima de 60°C), o tamanho do *primer* (estipulou-se o valor ideal de mínimo 20 e máximo 24pb), o tamanho do Amplicão (variou entre 130pb a 190pb), a composição e conteúdo GC (obteve-se um mínimo de 40% e máximo de 50%) e a possibilidade de formação de dímeros e *hairpins* entre si (apresentaram baixa probabilidade, com valores entre -2.6 a -1 kcal/mol); posteriormente, foi confirmada a especificidade dos quatro pares de *primers* seleccionados no programa *AutoDimer*. As características dos *primers* utilizados encontram-se descritos na tabela I.

Tabela I. Primers utilizados na investigação.

Primer	Sequência dos Primers (3'-5')	Tamanho do Primer (pb)	Amplificação (pb)	Temperatura <i>Melting</i> (°C)	$\Delta G$ (kcal/mol)
<b>FW104</b>	AACTAGAGGCAGGGAGGAG	20	189	60.82	-1,8
<b>RV104</b>	GATGTGTCCTAGATAGAGACCAG	23		59.43	
<b>FW109</b>	AACGAAGTAACATCCATCTCC	21	134	57.94	-1,3
<b>RV109</b>	GGCAGTTTGTATGGTTATTTCC	22		58.11	
<b>FW121</b>	TCCCTTTAATGCCAGACATTTCTC	24	145	61.40	-2,15
<b>RV121</b>	GCTGAGATGACTGCACTCCA	20		62.39	
<b>FW168</b>	TGGCTTAGTTCTTGGTATGGG	21	189	59.94	-2,52
<b>RV168</b>	GGTCTCTAATGCAAGTTTGGT	21		58.70	

Esta etapa da investigação foi realizada utilizando o DNA obtido de cada amostra, como molde para a reação de amplificação, no termociclador 9700 *GeneAmp PCR System* (Applied Biosystems®). Todas as reações de amplificação foram realizadas na sala de PCR e englobaram um controlo positivo *DNA Control 007* (Applied Biosystems®), e um controlo negativo efetuado com água ultrapura *DNAse free water* (Qiagen®).

A PCR foi efetuada num volume final de 20,0  $\mu\text{L}$  através da adição dos componentes descritos na tabela II.

Tabela II. Componentes da reação de PCR.

<i>HotStarTaq Plus Master Mix</i>	10,0 $\mu\text{L}$
<i>Primer Forward</i> (10,0 $\mu\text{M}$ )	1,0 $\mu\text{L}$
<i>Primer Reverse</i> (10,0 $\mu\text{M}$ )	1,0 $\mu\text{L}$
Produto da extração (DNA)	1,0 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <i>Nuclease Free</i>	7,0 $\mu\text{L}$
<b>Volume Total</b>	<b>20,0 <math>\mu\text{L}</math></b>

As condições da PCR utilizadas no termociclador encontram-se descritas na tabela III.

**Tabela III.** Condições para a reação de PCR.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturação Inicial</b>	95	15	1
<b>Desnaturação</b>	94	0:30	38
<b>Annealing</b>	57	0:30	
<b>Extensão</b>	72	1	
<b>Extensão Final</b>	72	10	1
<b>Armazenamento</b>	4	∞	

As regiões-alvo e os produtos amplificados foram separados e a sua existência comprovada utilizando o sistema *QiAxcel Advanced* (Qiagen®).

Foi utilizado um marcador de peso molecular 15-1000pb. A separação das bandas foi realizada durante 30 minutos com uma potência 5,0 kV.

### 3.4. Purificação dos produtos da PCR

Após o procedimento anterior, como permaneciam na mistura amplificada dNTPs e *primers*, que no decorrer da PCR não foram consumidos e que podem induzir interferências nas leituras das etapas posteriores, estes foram removidos.

Assim, a remoção destes componentes e consequente purificação dos produtos amplificados foi realizada através do tratamento com *ExoSAP-IT*® (Affymetrix®). Para o efeito foi adicionado, diretamente no produto de PCR, 5,0 µL do reagente a cada amostra, totalizando um volume final de 25,0 µL, sob as condições ilustradas na tabela IV.

**Tabela IV.** Condições para o tratamento com *ExoSAP-IT*<sup>®</sup>.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Incubação</b>	37	15	1
<b>Inativação</b>	80	15	1
<b>Armazenamento</b>	4	∞	

### 3.5. Sequenciação de DNA

A caracterização completa de um fragmento de DNA amplificado implica a determinação por sequenciação de DNA da sua sequência de nucleótidos.

Após a purificação dos produtos amplificados iniciou-se a reação de sequenciação. Para tal foi utilizado o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems<sup>®</sup>), no termociclador *9700 GeneAmp PCR System* (Applied Biosystems<sup>®</sup>), validado no SGBF-N para um volume final de 10,0 µL e utilizando as instruções do manual, tal como se pode observar na tabela V.

**Tabela V.** Componentes da reação de sequenciação.

<i>BigDye Terminator Mix v3.1</i>	2,0 µL
<i>Primer</i> (3,2 µM)	1,0 µL
<i>BigDye Terminator v3.1 5x Buffer</i>	1,0 µL
Produto da reação de PCR	1,0 µL
H <sub>2</sub> O <i>Nuclease Free</i>	5,0 µL
<b>Volume Total</b>	<b>10,0 µL</b>

Após esta reação, os produtos foram purificados utilizando o *kit BigDye® XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems®), seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante. A reação de purificação, com este *kit*, requereu a adição de dois reagentes (BigDye XTerminator™ Solution e SAM™ Solution), os quais foram adicionados sequencialmente. Foi utilizado 10,0 µL de *BigDye XTerminator™ Solution* e 45,0 µL de *SAM™ Solution*, totalizando um volume final da reação de 65,0 µL. Posteriormente, cada placa foi selada com película *Sealing Film MF-300* (Case®), agitada num *vortex IKA® MS3 digital* durante 30 minutos a 2000rpm e centrifugada no aparelho *Centrifuge 5810* (Eppendorf®) a 1000g durante 2 minutos.

As amostras foram previamente preparadas para a sua análise, adicionando-se 10,0 µL de produto amplificado e purificado a 6,0 µL de *Hi-Di™ Formamida Genetic Analysis Grade* (Applied Biosystems®).

Posteriormente, as amostras foram sequenciadas automaticamente, utilizando o equipamento *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®), com polímero POP6 (*POP-6™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers*) e os capilares de 36cm (*3130xl/3130 Genetic Analyzer 16-Capillary Array 16x36cm*, Applied Biosystems®).

### 3.6. Análise dos resultados

Para a determinação automática dos fragmentos amplificados recorreu-se ao *software Sequencing Analysis Software® v6.0* (Applied Biosystems). Posteriormente, foi realizada a comparação das sequências obtidas com as sequências consenso através da aplicação do *software Sequence Scape Software® v3.0* (Applied Biosystems).

Nos procedimentos estatísticos foi utilizado o programa SPSS, versão 24 para Windows e o programa Excel, versão Office 2013 para Windows 10. Relativamente ao tratamento dos dados estatísticos, utilizaram-se as seguintes operações: análise descritiva dos dados com média aritmética e desvio padrão. De modo a aferir a existência de associação entre as variáveis estudadas, foram efetuadas correlações bivariadas em teste Qui-quadrado, sendo considerado um nível de confiança de 95%,  $P \leq 0.05$ .

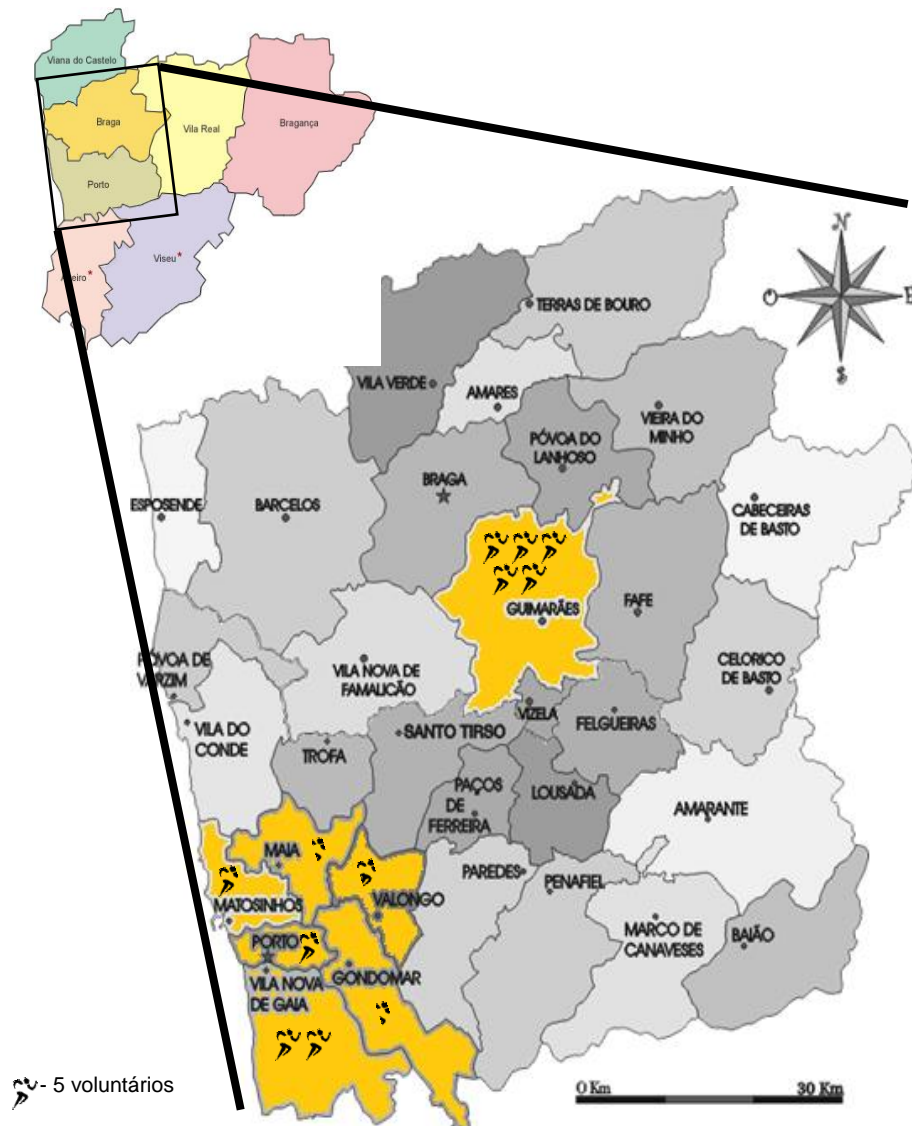


## 4. Resultados



#### 4.1. Caracterização da amostra total examinada

Como referido no capítulo anterior, na execução do presente estudo foi utilizado um conjunto de amostras de material biológico proveniente de 50 voluntários, sendo que as amostras foram recolhidas a cada voluntário nos seus concelhos de proveniência, tal como demonstrada na figura 1.



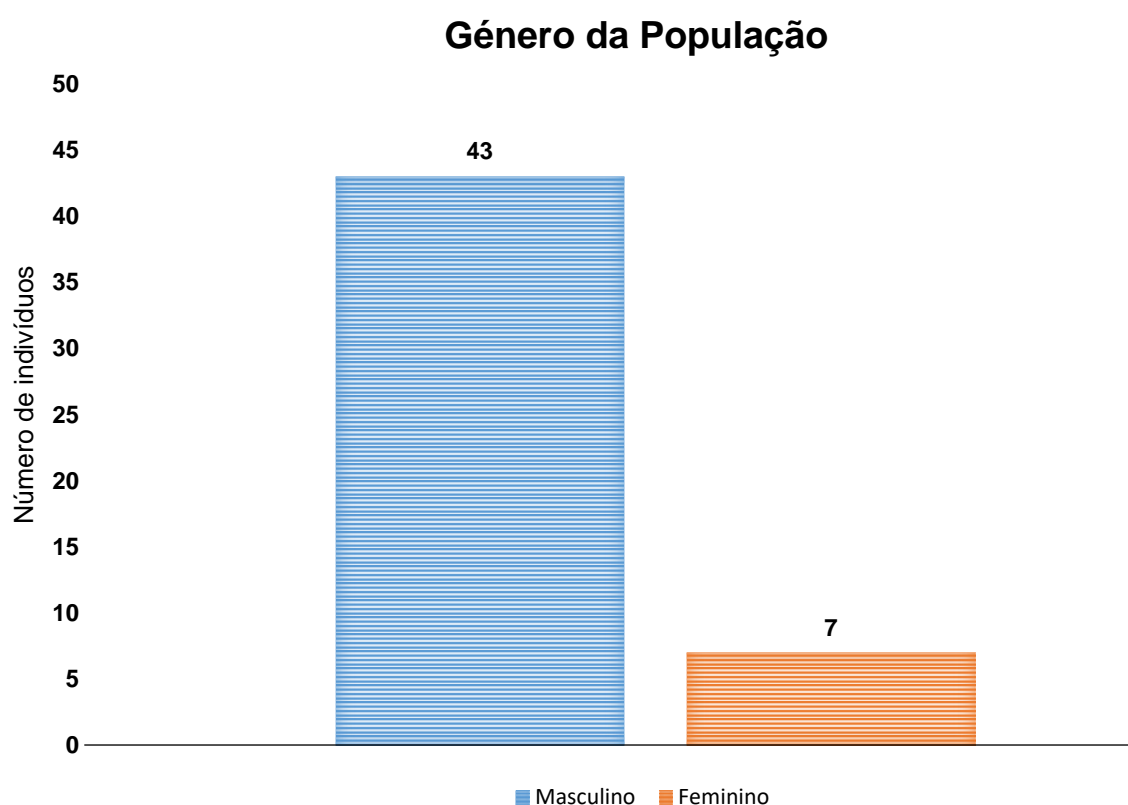
**Figura 1.** Distribuição da amostra total pelos concelhos de proveniência dos voluntários aquando da entrada no estudo.

Na figura 2 e tabela VI seguintes, apresentam-se as frequências de indivíduos aplicando a distinção entre sexos.

A população feminina foi composta por 7 indivíduos (14,0%). Já os indivíduos masculinos integraram 43 voluntários (86,0%).

**Tabela VI.** Frequências das amostras.

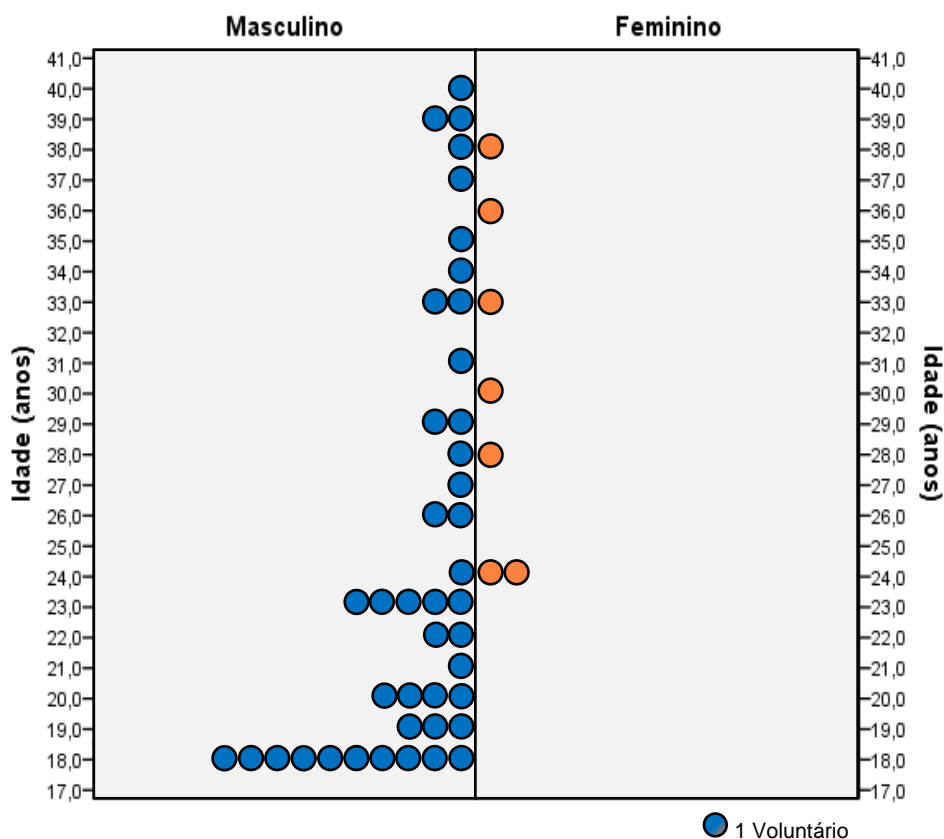
<b>Gênero</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Masculino</b>	43	86,0 %
<b>Feminino</b>	7	14,0 %
<b>Total</b>	50	100,0 %



**Figura 2.** Distribuição da amostra total por gênero.

O universo de amostra analisado, tal como se pode observar pela figura 3, foi constituída por indivíduos que se situavam entre os 18 e 40 anos, conferindo uma

amplitude de 23 anos. No caso da amostra masculina, o intervalo de idades situava-se entre os 18 e os 40 anos, com uma amplitude de 23 anos (grupo onde se encontram a maioria dos voluntários deste estudo). Na amostra feminina, o intervalo de idades situava-se entre os 24 e os 38 anos, com uma amplitude de 15 anos.



**Figura 3.** Distribuição da amostra total pelas idades e género dos voluntários.

Como se pode verificar pela observação dos dados supra descritos, a distribuição etária foi uniforme, verificando-se uma dispersão satisfatória no intervalo em estudo, com predominância para idades mais baixas no sexo masculino.

Tal como se encontra resumido na tabela VII, a amostra masculina examinada caracterizou-se por apresentar uma média de idades na ordem dos 25,52 anos, a mediana de 23,00 anos e um desvio padrão de 7,11. Em relação à amostra feminina, a média de idades observada foi de 30,43 anos, a mediana de 30,00 anos e o desvio padrão de 5,53. O valor médio para os dois sexos registou um valor de 25,52 anos, mediana de 23,00 e desvio padrão de 7,14.

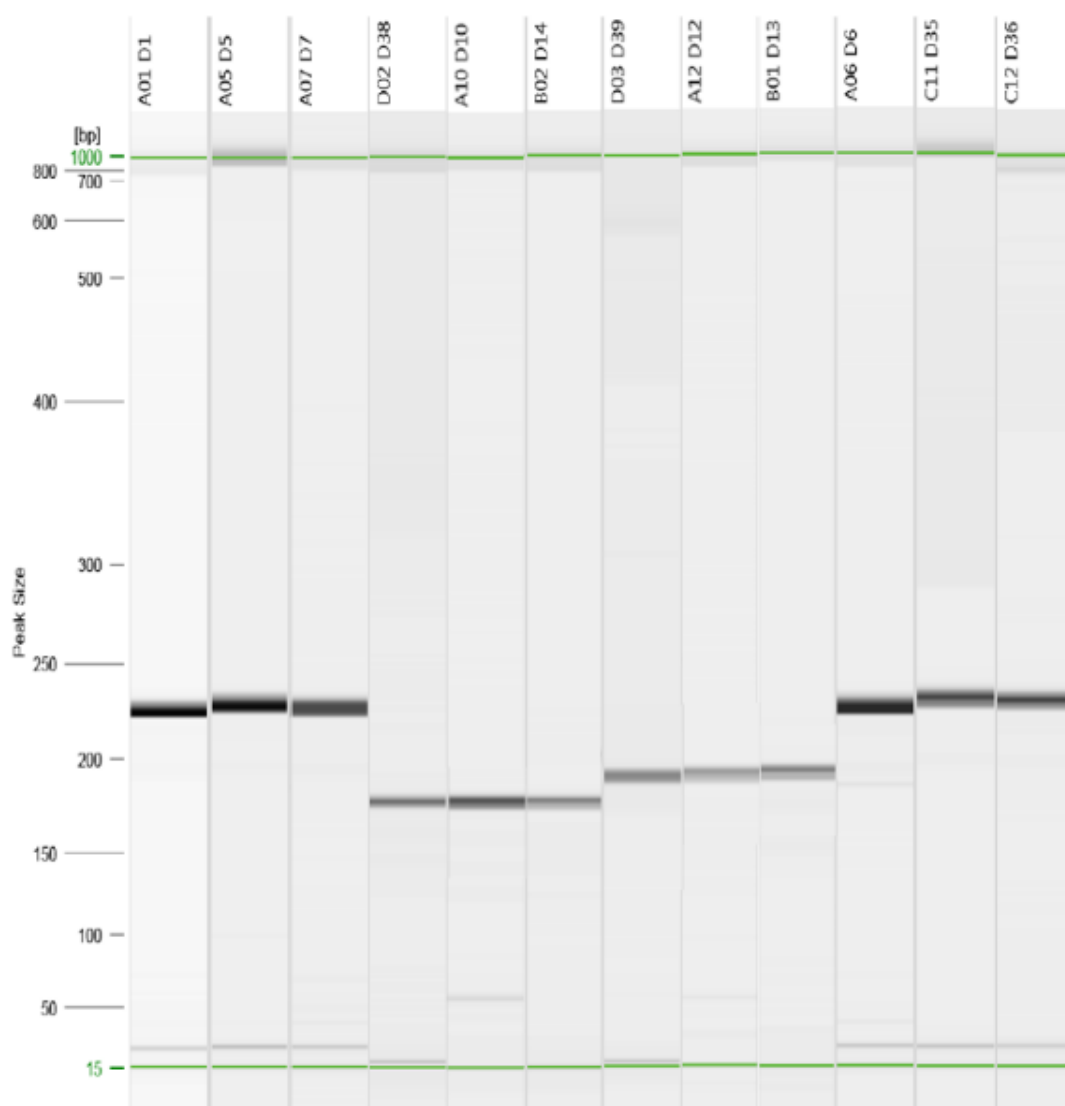
**Tabela VII.** Caracterização da amostra analisada (número de indivíduos em estudo (N), média, mediana, moda, desvio padrão, variância, intervalo, amplitude e erro padrão da média).

<b>Género</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>População Total</b>
<b>N</b>	43	7	50
<b>Média</b>	24,72	30,43	25,52
<b>Mediana</b>	23,00	30,00	23,00
<b>Moda</b>	18,00	24,00	18,00
<b>Desvio Padrão</b>	7,11	5,53	7,14
<b>Variância</b>	50,49	30,62	51,03
<b>Máximo</b>	40,00	38,00	40,00
<b>Mínimo</b>	18,00	24,00	18,00
<b>Amplitude</b>	23,00	15,00	23,00
<b>Erro padrão de média</b>	1,08	2,09	1,01

## 4.2. Procedimento laboratorial

A amplificação dos produtos de PCR foi confirmada por eletroforese capilar (sistema QIAxcel). Neste sistema foi possível detetar a presença de 4 grupos distintos de amplificações com bandas de diferentes tamanhos, como se observa na figura 4, 25 e 26.

A banda formada visível é formada de acordo com o tamanho do produto amplificado, resultando da soma do tamanho do par de *primers* com o tamanho do amplicão da sequência-alvo.














**Figura 4.** Eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) da PCR *singleplex* utilizada para as regiões-alvo amplificadas.

### 4.2.1. Polimorfismo rs10494366

Na tabela VIII é possível visualizar os perfis das sequências obtidas para as amostras de referência estudadas do polimorfismo rs10494366.

**Tabela VIII.** Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs10494366.

Indivíduo	Sequência consenso	Sequência analisada	Locus
ID1	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID2	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	GG
ID3	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	GG
ID4	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID5	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID6	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID7	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID8	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	GG
ID9	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID10	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID11	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	GG
ID12	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID13	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID14	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	GG
ID15	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID16	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG
ID17	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID18	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID19	G C A G ? T T T T	G C A G  T T T T T	TG

ID20			TT
ID21			TT
ID22			TT
ID23			TT
ID24			TT
ID25			TT
ID26			GG
ID27			TT
ID28			TG
ID29			TG
ID30			TG
ID31			GG
ID32			GG
ID33			TG
ID34			TG
ID35			TG
ID36			TT
ID37			TT
ID38			TG
ID39			TG
ID40			TT
ID41			GG
ID42			TT
ID43			TT

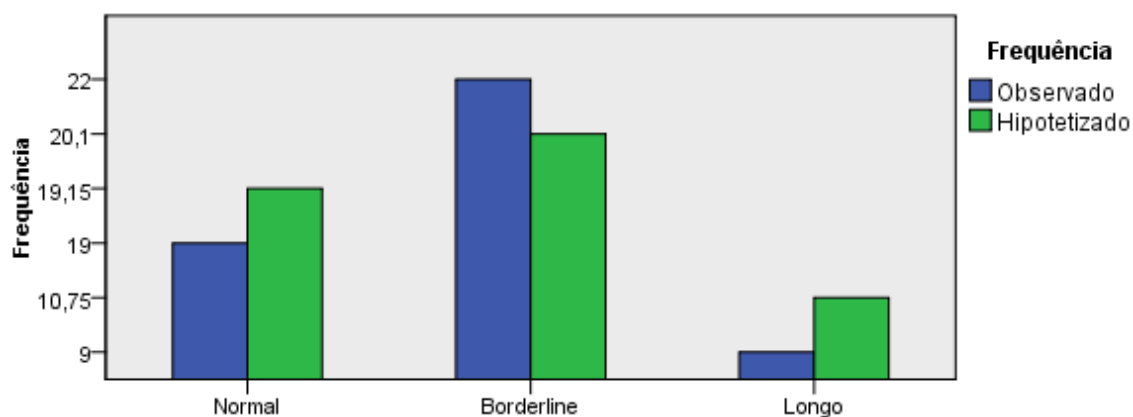


ID44	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID45	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	TG
ID46	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID47	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	TG
ID48	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID49	G C A G ? T T T T	G C A G T T T T T	TT
ID50	G C A G ? T T T T	G C A G G T T T T	TG

Na tabela IX e na figura 5 avaliou-se a existência da associação entre a variável estudada e a variável hipotetizada para o SNP rs10494366, tendo sido efetuada uma correlação bivariada, através do teste Qui-quadrado, para um nível de confiança de 95%,  $p \leq 0.05$ .

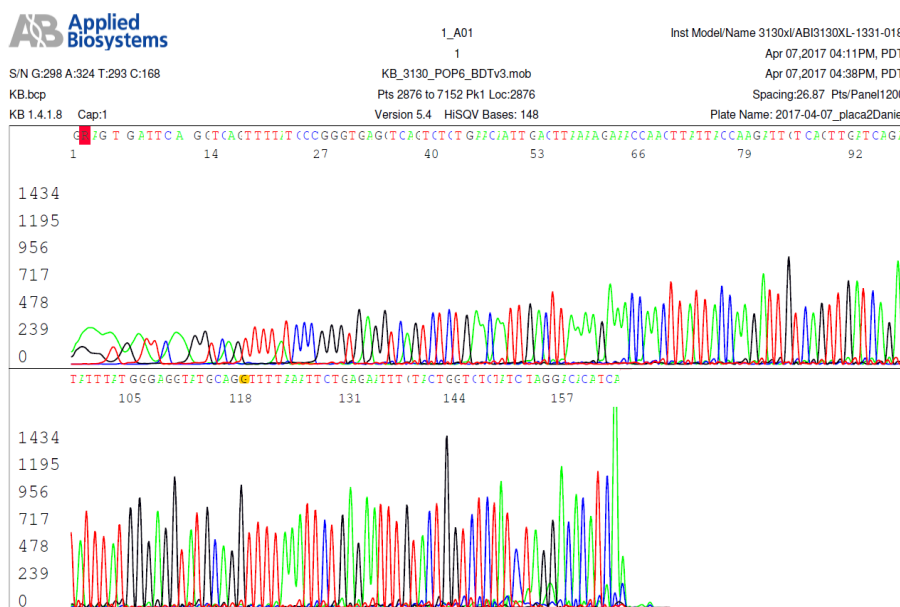
**Tabela IX.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366.

Genótipo	Normal (TT)	<i>Borderline</i> (TG)	Longo (GG)
N observado	19,00	22,00	9,00
N esperado	19,20	20,10	10,80
N total	50,00		
Estatística de teste	0,47		
Graus de liberdade	2,00		
Significância	0,79		

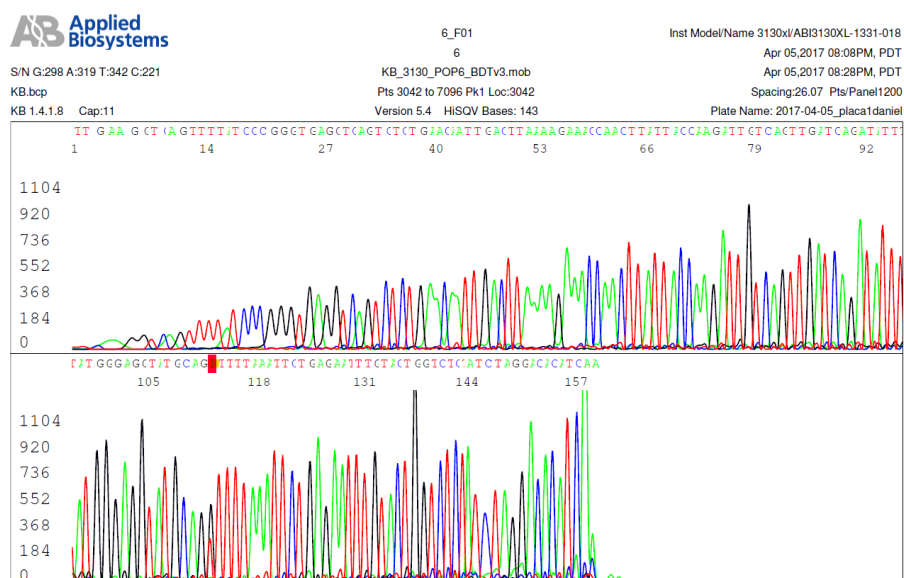


**Figura 5.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366.

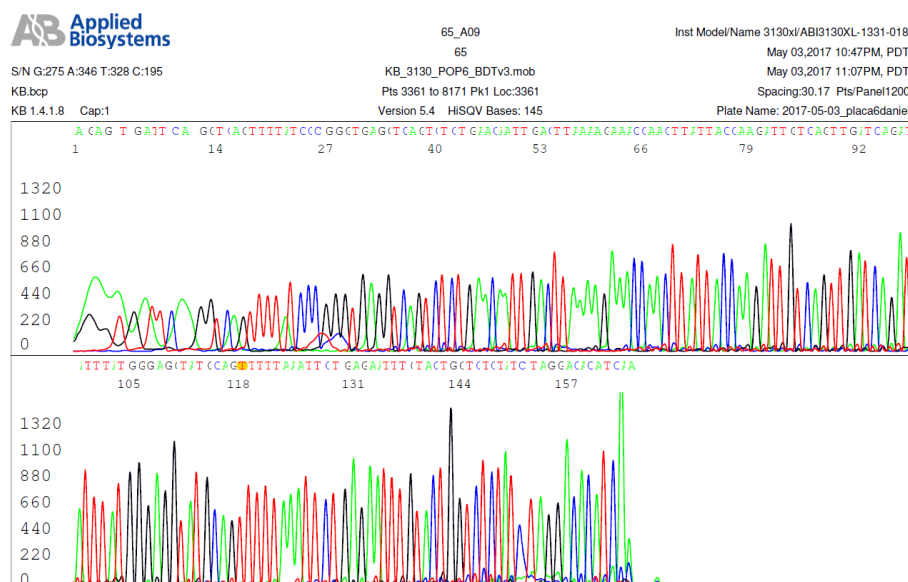
Nas figuras 6,7 e 8 é possível observar exemplos das sequências obtidas para o SNP rs10494366 dos genótipos GG, TG e TT, respectivamente.



**Figura 6.** Sequência obtida para o SNP rs10494366 com o genótipo GG.



**Figura 7.** Sequência obtida para o SNP rs10494366 com o genótipo TG.




**Figura 8.** Sequência obtida para o SNP rs10494366 com o genótipo TT.

## 4.2.2. Polimorfismo rs10918594

A comparação das sequências consenso e analisadas para o polimorfismo rs10918594 pode ser visualizada na Tabela X.

**Tabela X.** Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs10918594.

Indivíduo	Sequência consenso	Sequência analisada	Locus
ID1	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	GG
ID2	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	GG
ID3	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CG
ID4	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID5	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID6	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CG
ID7	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID8	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	GG
ID9	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CG
ID10	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID11	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	GG
ID12	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID13	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CG
ID14	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	GG
ID15	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CG
ID16	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	GG
ID17	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID18	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID19	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CG

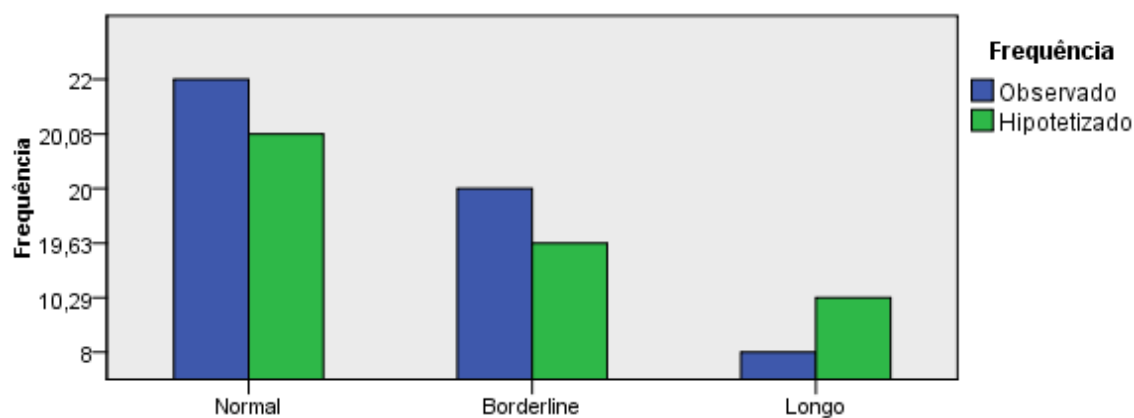
ID20			CG
ID21			CG
ID22			CC
ID23			CC
ID24			CC
ID25			CC
ID26			GG
ID27			CC
ID28			CG
ID29			CG
ID30			CC
ID31			CG
ID32			CG
ID33			CG
ID34			CC
ID35			CC
ID36			CG
ID37			CC
ID38			CG
ID39			CG
ID40			CC
ID41			GG
ID42			CG
ID43			CC

ID44	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID45	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID46	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID47	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	CG
ID48	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	CG
ID49	G A G A ? A G T T	G A G A C A G T T	CC
ID50	G A G A ? A G T T	G A G A G A G T T	CG

Na tabela XI e na figura 9 avaliou-se a existência da associação entre a variável estudada e a variável hipotetizada para o SNP rs10918594, tendo sido efetuada uma correlação bivariada, através do teste Qui-quadrado, para um nível de confiança de 95%,  $p \leq 0.05$ .

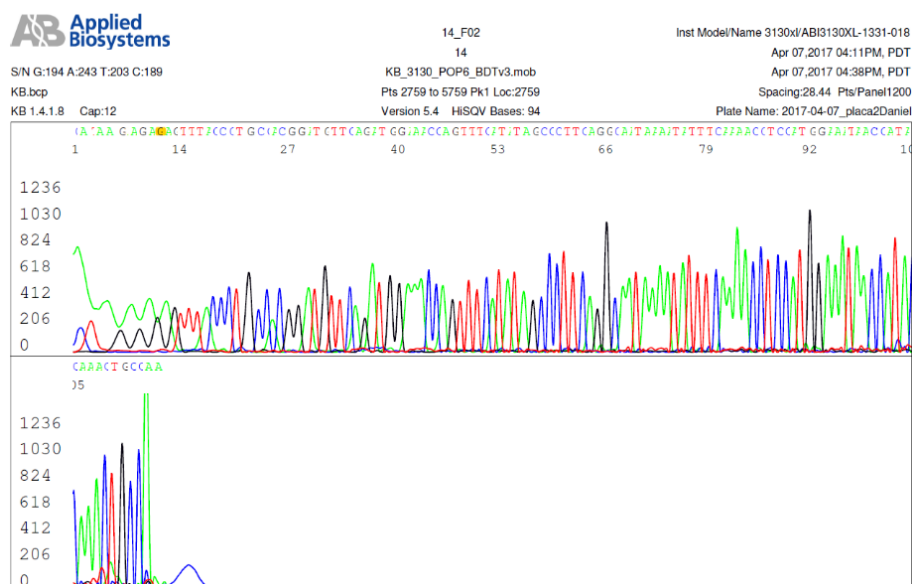
**Tabela XI.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594.

Genótipo	Normal (CC)	<i>Borderline</i> (CG)	Longo (GG)
<b>N observado</b>	22,00	20,00	8,00
<b>N esperado</b>	20,10	19,60	10,30
<b>N total</b>	50		
<b>Estatística de teste</b>	0,70		
<b>Graus de liberdade</b>	2		
<b>Significância</b>	0,71		

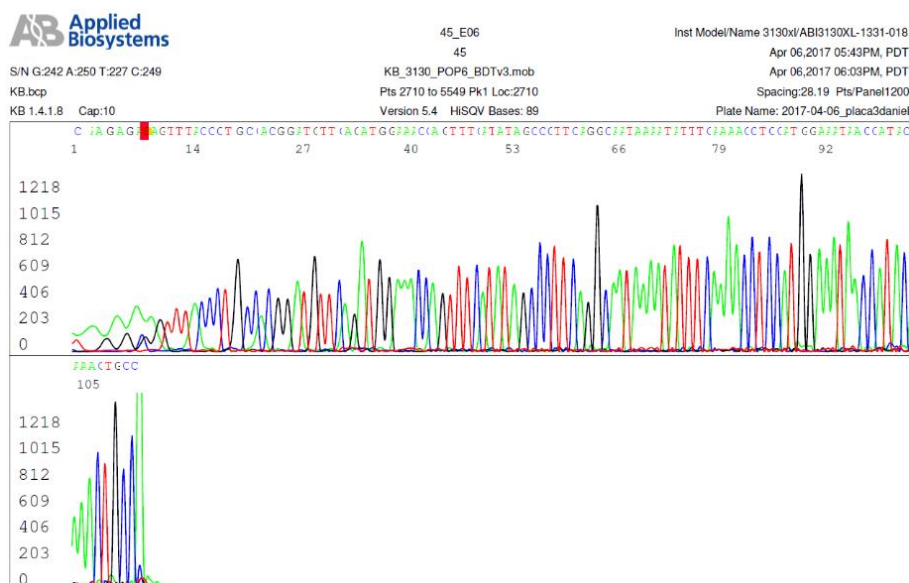


**Figura 9.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594.

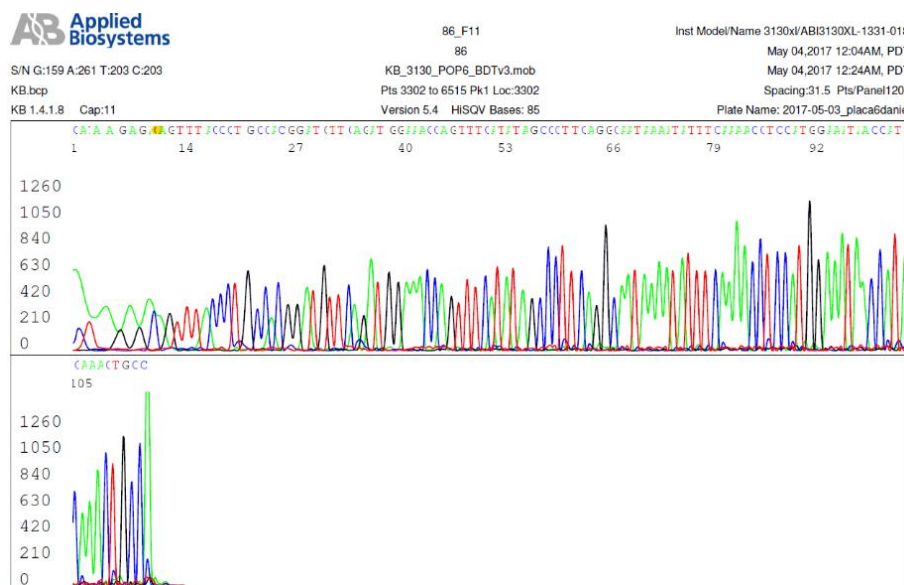
Nas figuras 10,11 e 12 é possível observar exemplos das sequências obtidas para o SNP rs10918594 dos genótipos GG,CG e CC, respetivamente.



**Figura 10.** Sequência obtida para o SNP rs10918594 com o genótipo GG.



**Figura 11.** Sequência obtida para o SNP rs10918594 com o genótipo CG.



**Figura 12.** Sequência obtida para o SNP rs10918594 com o genótipo CC.



### 4.2.3. Polimorfismo rs12143842

A comparação das sequências consenso e analisadas para o polimorfismo rs12143842 pode ser observada na Tabela XII.

**Tabela XII.** Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs12143842.

Indivíduo	Sequência consenso	Sequência analisada	Locus
ID1	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID2	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID3	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID4	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID5	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID6	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID7	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID8	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID9	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID10	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID11	A G T T ? A A A A	A G T T T A A A A A	TT
ID12	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID13	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID14	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID15	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT
ID16	A G T T ? A A A A	A G T T T A A A A A	TT
ID17	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID18	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A A	CC
ID19	A G T T ? A A A A	A G T T C T A A A A	CT

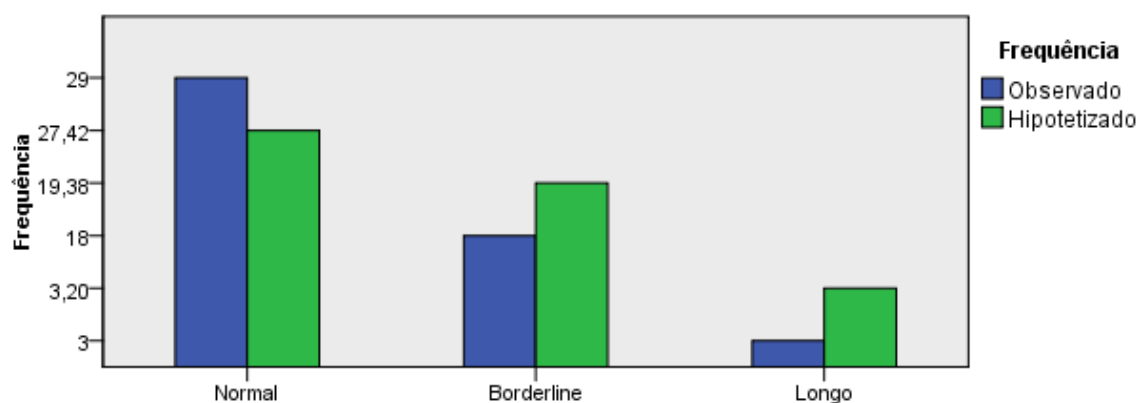
ID20			CC
ID21			CC
ID22			CC
ID23			CC
ID24			CC
ID25			CC
ID26			CT
ID27			CC
ID28			CT
ID29			CT
ID30			CC
ID31			CC
ID32			CC
ID33			CT
ID34			CC
ID35			CC
ID36			CC
ID37			CC
ID38			CT
ID39			CT
ID40			CC
ID41			TT
ID42			CC
ID43			CC

ID44	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A	CC
ID45	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A	CC
ID46	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A	CC
ID47	A G T T ? A A A A	A G T T T A A A A	CT
ID48	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A	CC
ID49	A G T T ? A A A A	A G T T C A A A A	CC
ID50	A G T T ? A A A A	A G T T T A A A A	CT

Na tabela XIII e na figura 13 avaliou-se a existência da associação entre a variável estudada e a variável hipotetizada para o SNP rs12143842, tendo sido efetuada uma correlação bivariada, através do teste Qui-quadrado, para um nível de confiança de 95%,  $p \leq 0.05$ .

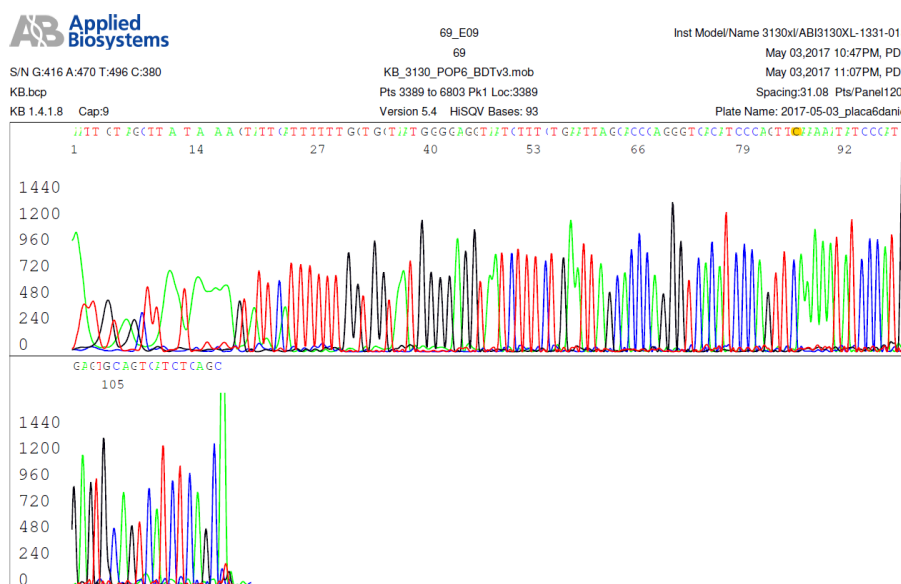
**Tabela XIII.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs12143842.

Genótipo	Normal (CC)	<i>Borderline</i> (CT)	Longo (TT)
<b>N observado</b>	29,00	18,00	3,00
<b>N esperado</b>	27,40	19,40	3,20
<b>N total</b>	50,00		
<b>Estatística de teste</b>	0,20		
<b>Graus de liberdade</b>	2,00		
<b>Significância</b>	0,90		

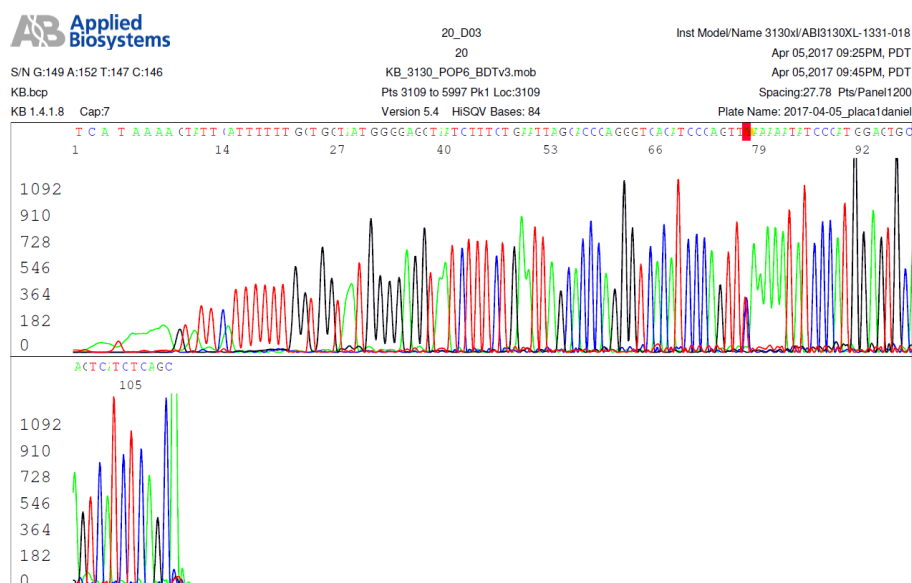


**Figura 13.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs12143842.

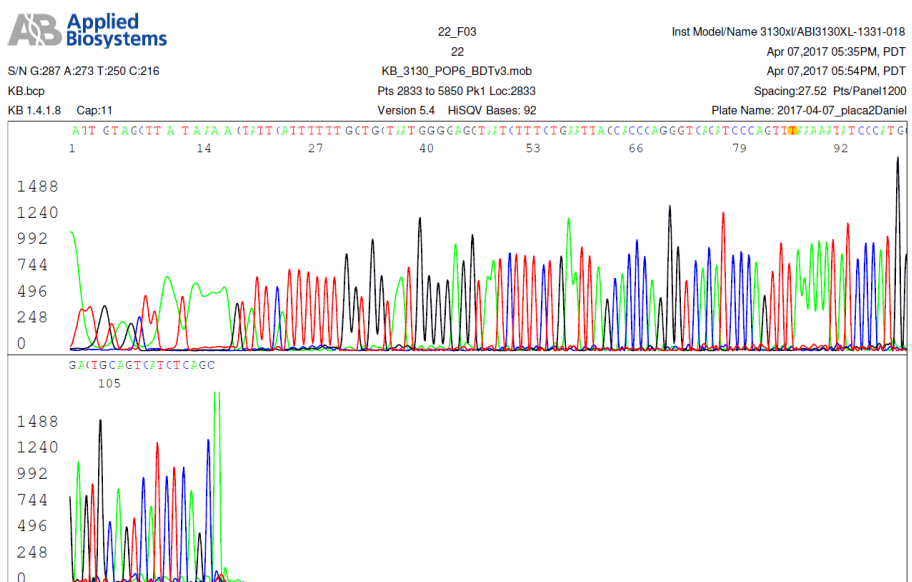
Nas figuras 14,15 e 16 é possível observar exemplos das sequências obtidas para o SNP rs12143842 dos genótipos CC,CT e TT, respectivamente.



**Figura 14.** Sequência obtida para o SNP rs12143842 com o genótipo CC.



**Figura 15.** Sequência obtida para o SNP rs12143842 com o genótipo CT.

























































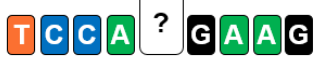





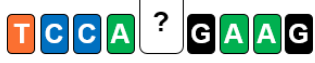









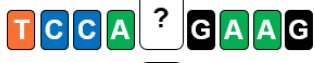





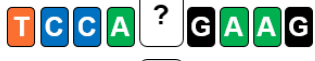









**Figura 16.** Sequência obtida para o SNP rs12143842 com o genótipo TT.

## 4.2.4. Polimorfismo rs16847548

A comparação das sequências consenso e analisadas para o polimorfismo rs16847548 pode ser observada na Tabela XIV.

**Tabela XIV.** Perfis genéticos da sequência onde se encontra o polimorfismo rs16847548.

Indivíduo	Sequência consenso	Sequência analisada	Locus
ID1			TC
ID2			TC
ID3			TC
ID4			TT
ID5			TT
ID6			TC
ID7			TT
ID8			CC
ID9			TC
ID10			TT
ID11			CC
ID12			TT
ID13			TC
ID14			TC
ID15			TT
ID16			CC
ID17			TT
ID18			TT
ID19			CC

ID20			TT
ID21			TT
ID22			TT
ID23			TT
ID24			TT
ID25			TT
ID26			CC
ID27			TT
ID28			TC
ID29			TC
ID30			TT
ID31			TC
ID32			TC
ID33			TC
ID34			TT
ID35			TT
ID36			TT
ID37			TT
ID38			TC
ID39			TC
ID40			TT
ID41			CC
ID42			TT
ID43			TT

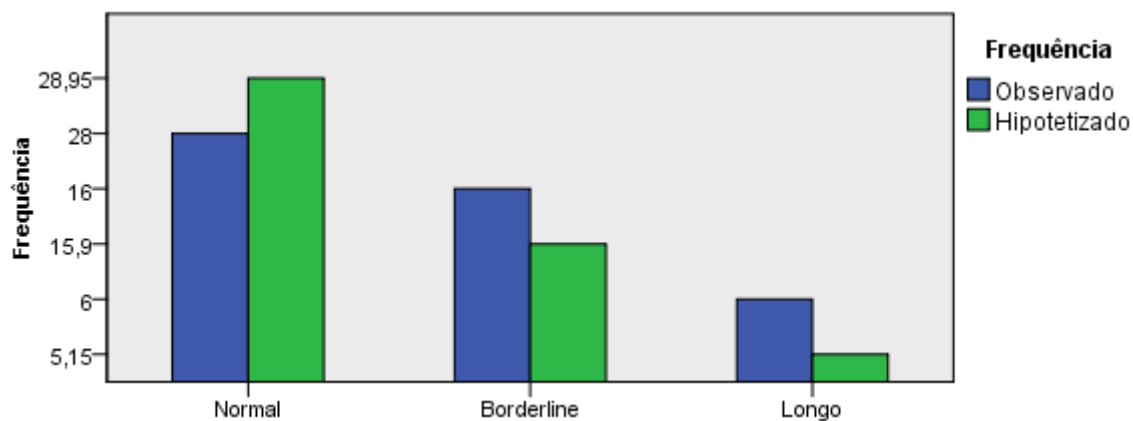
ID44	T C C A ? G A A G	T C C A T G A A G	TT
ID45	T C C A ? G A A G	T C C A T G A A G	TT
ID46	T C C A ? G A A G	T C C A T G A A G	TT
ID47	T C C A ? G A A G	T C C A T C G A A G	TC
ID48	T C C A ? G A A G	T C C A T G A A G	TT
ID49	T C C A ? G A A G	T C C A T G A A G	TT
ID50	T C C A ? G A A G	T C C A T C G A A G	TC

Na tabela XV e na figura 17 avaliou-se a existência da associação entre a variável estudada e a variável hipotetizada para o SNP rs16847548, tendo sido efetuada uma correlação bivariada, através do teste Qui-quadrado, para um nível de confiança de 95%,  $p \leq 0.05$ .

Tabela XV. Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548.

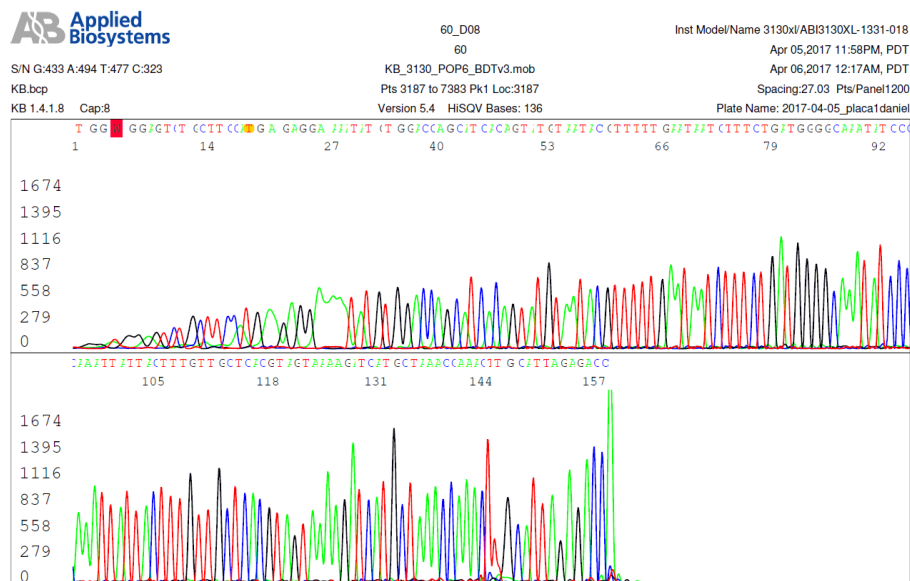
Genótipo	Normal (TT)	Borderline (TC)	Longo (CC)
N observado	28,00	16,00	6,00
N esperado	29,00	15,90	5,20
N total	50		
Estatística de teste	0,17		
Graus de liberdade	2		
Significância	0,92		



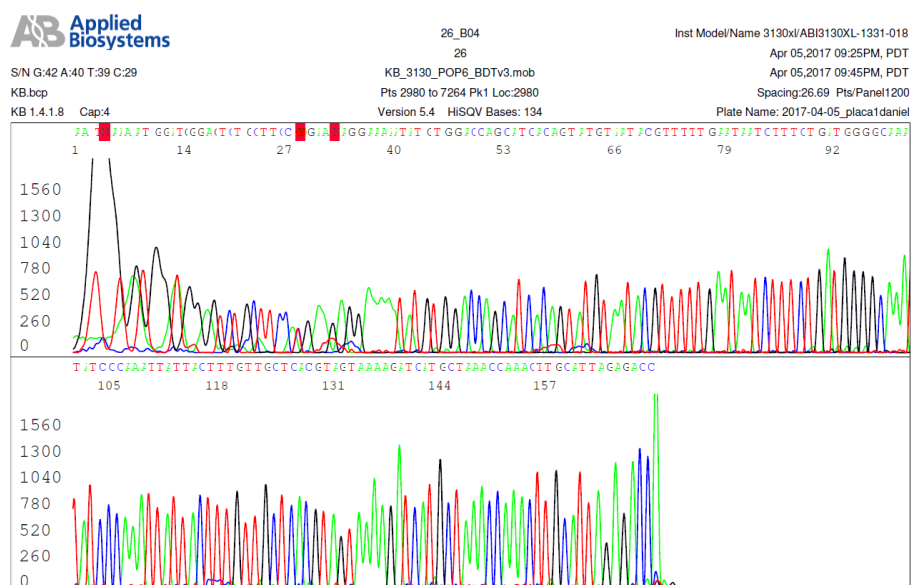


**Figura 17.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548.

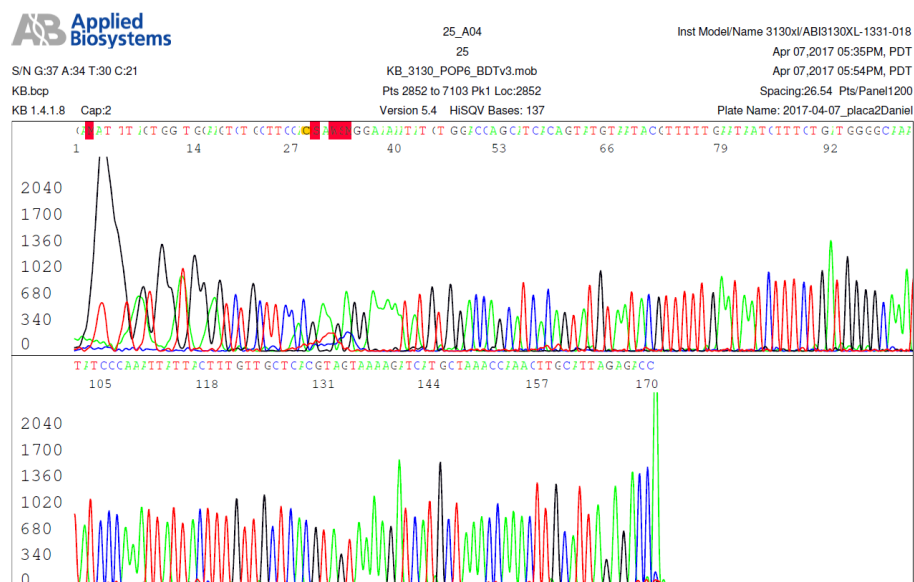
Nas figuras 18,19 e 20 é possível observar exemplos das sequências obtidas para o SNP rs16847548 dos genótipos TT,TC e CC, respectivamente.



**Figura 18.** Sequência obtida para o SNP rs16847548 com o genótipo TT.



**Figura 19.** Sequência obtida para o SNP rs16847548 com o genótipo TC.



**Figura 20.** Sequência obtida para o SNP rs16847548 com o genótipo CC.

### 4.3. Análise conjunta dos polimorfismos estudados

Do alinhamento, foi possível identificar a presença de perfis completos das sequências alvo em todas as amostras estudadas os quatro polimorfismos a analisar, tal como se observa nas figuras 27, 28, 29 e 30.

Na tabela XVI pode-se observar a compilação dos resultados obtidos para cada indivíduo do estudo.

**Tabela XVI.** Resultados obtidos de todas as sequenciações e aplicação do sistema de pontuação criado para a distinção dos voluntários.

Amostra	Polimorfismo				Resultado	Pontuação	Total	Grupo
	1 0 4	1 0 9	1 2 1	1 6 8				
ID1					TG	1	6	IIIa
					GG	3		
					CT	1		
					TC	1		
ID2					GG	3	8	IIIa
					GG	3		
					CT	1		
					TC	1		
ID3					GG	3	6	IIIa
					CG	1		
					CT	1		
					TC	1		
ID4					TG	1	1	I
					CC	0		
					CC	0		
					TT	0		
ID5					TG	1	1	I
					CC	0		
					CC	0		
					TT	0		
ID6					TG	1	4	II
					CG	1		
					CT	1		
					TC	1		
ID7					TG	1	1	I
					CC	0		
					CC	0		
					TT	0		

ID8			GG	3	10	IIIb
			GG	3		
			CT	1		
			CC	3		
ID9			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID10			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID11			GG	3	12	IIIb
			GG	3		
			TT	3		
			CC	3		
ID12			TG	1	1	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID13			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID14			GG	3	8	IIIa
			GG	3		
			CT	1		
			TC	1		
ID15			TG	1	3	II
			CG	1		
			CT	1		
			TT	0		
ID16			TG	1	10	IIIb
			GG	3		
			TT	3		
			CC	3		
ID17			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID18			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		

ID19			TG	1	6	IIIa
			CG	1		
			CT	1		
			CC	3		
ID20			TT	0	1	I
			CG	1		
			CC	0		
			TT	0		
ID21			TT	0	1	I
			CG	1		
			CC	0		
			TT	0		
ID22			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID23			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID24			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID25			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID26			GG	3	10	IIIb
			GG	3		
			CT	1		
			CC	3		
ID27			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID28			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID29			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		

ID30			TG	1	1	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID31			GG	3	5	II
			CG	1		
			CC	0		
			TC	1		
ID32			GG	3	5	II
			CG	1		
			CC	0		
			TC	1		
ID33			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID34			TG	1	1	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID35			TG	1	1	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID36			TT	0	1	I
			CG	1		
			CC	0		
			TT	0		
ID37			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID38			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID39			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID40			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		

ID41			GG	3	12	IIIb
			GG	3		
			TT	3		
			CC	3		
ID42			TT	0	1	I
			CG	1		
			CC	0		
			TT	0		
ID43			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID44			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID45			TG	1	1	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID46			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID47			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		
ID48			TT	0	1	I
			CG	1		
			CC	0		
			TT	0		
ID49			TT	0	0	I
			CC	0		
			CC	0		
			TT	0		
ID50			TG	1	4	II
			CG	1		
			CT	1		
			TC	1		

## **5. Discussão**





## 5.1. Procedimento laboratorial inicial

Uma correta recolha de amostras é indispensável à otimização do procedimento analítico e dos resultados que são obtidos para a posterior interpretação que sobre eles se possa efetuar. Para tal, devem ser adotadas estratégias que providenciam uma colheita de amostras representativa da população em estudo e executada sob as mesmas condições. É também muito importante identificar claramente cada amostra e assegurar a sua chegada ao laboratório com a maior brevidade possível, por forma a não sofrerem deterioração e/ou contaminação.

Primeiramente, o protocolo laboratorial tem início na etapa de extração das várias amostras de referência colhidas ( $n=50$ ). O método de extração utilizado permite a lise das estruturas proteicas e a obtenção de DNA purificado e de elevada qualidade. Permite também a remoção de inibidores de PCR e a diminuição do risco de contaminação, devido à selagem isolada de cada reagente existente no *kit*. O resultado final da aplicação deste *kit* apresenta-se sob a forma de um rendimento global aumentado, permitindo a obtenção de bons resultados.

Após a extração, as sequências polimórficas de interesse devem ser amplificadas aplicando o par específico de *primers* para cada polimorfismo estudado.

O método de PCR *singleplex* executado acompanha o plano do protocolo geral de PCR, no entanto é aconselhado que este seja otimizado tendo em consideração vários fatores, como o desenho dos *primers*, (comprimento,  $\Delta G$ , concentração e temperatura de *annealing*), a concentração da amostra e o número de ciclos utilizados. Estes fatores evitam a introdução de mutações com a DNA polimerase, dos efeitos competitivos de “*mispriming*”, que resultam de erros na incorporação dos nucleótidos e, a formação de dímeros entre *primers*, uma vez que estes produtos inespecíficos são amplificados de forma mais eficiente do que as regiões alvo, dependendo dos componentes da reação, produzindo bandas inespecíficas e diminuindo as taxas de eficiência de *annealing* e extensão (que idealmente se situam entre 88% a 97%) [53].

Assim, é aconselhada a realização de testes aos *primers* utilizados em programas como o *Primer-Blast* e *AutoDimer*. Dessa avaliação não se detetam

interações entre *primers*, conferindo validade e eficácia à sua utilização nas reações *singleplex* do projeto.

A temperatura de *annealing* dos *primers* necessita de ser testada, por forma a ser obtida a maior eficácia no emparelhamento dos *primers*. Para os polimorfismos estudados a temperatura de 57°C é a que demonstrou a maior eficácia no emparelhamento dos *primers*.

## 5.2. Análise dos genótipos estudados

Após a PCR, a eficácia amplificação de cada amostra de DNA deve ser analisada por um protocolo de eletroforese. Perante os resultados anteriormente referidos, afirma-se que a PCR se mostrou eficiente para todas as amostras (n=200), não se tendo verificado qualquer amplificação inespecífica, os fragmentos obtidos detinham o tamanho teórico esperado.

Nas três primeiras bandas da figura 4 (D1, D5 e D7), relativas ao polimorfismo rs10494366 é possível observar produtos de amplificação com cerca de 230 pares de base, entrando em concordância com o esperado, de 232pb.

As bandas seguintes da figura 4 (D38, D10 e D14), pertencem a produtos de amplificação do polimorfismo rs10918594 com um tamanho de aproximadamente 180pb, corresponde ao valor expectável de 177pb.

O terceiro grupo de bandas da figura 4 (D39, D12 e D13), pertence a amplificações de amostras para o polimorfismo rs12143842 obteve três bandas com um tamanho na ordem dos 189pb, sendo este o valor esperado.

O último grupo de bandas da figura 4 (D6, D35, D36), corresponde a amplificações de amostras para o polimorfismo rs16847548 e apresenta um tamanho na ordem dos 230 pb e também aqui existe concordância com o tamanho teórico, que para este caso é 231pb.

Os resultados da eletroforese capilar confirmaram que a extração com *kit Prep-n-Go™* (Applied Biosystems®) é um método favorável para extrações em saliva e que o método de PCR *singleplex* utilizado é eficaz, tendo produzido resultados de amplificação inferiores a 300 pb e sem contaminação, o que facilita a obtenção dos perfis aquando da sua sequenciação.

Depois de confirmada a amplificação dos produtos de PCR, correspondentes às quatro regiões intrónicas seleccionadas do gene NOS1AP, as amostras necessitam de ser purificadas, seguindo-se as respetivas sequenciações.

Para todas as amostras estudadas obteve-se as sequências esperadas, sendo que não se observa qualquer erro ou informação desconexa no alinhamento entre a sequência de referência relativa ao gene NOS1AP e as sequências consenso.

### 5.2.1. Polimorfismo rs10494366

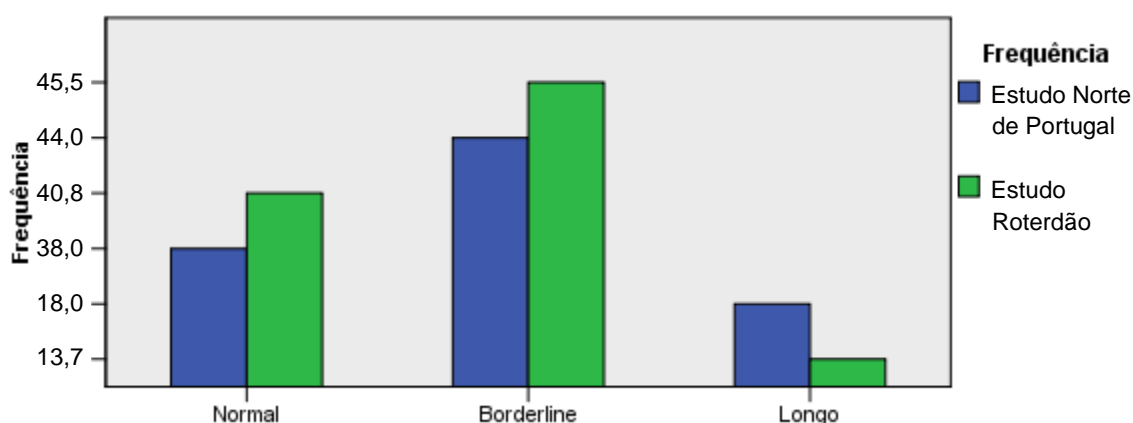
Da análise da tabela VIII, respeitante ao *locus* do polimorfismo rs10494366 é encontrado com maior frequência o genótipo TG (40,2% expectável [48] – 44,0% analisado), correspondente à situação clínica definida como *borderline* que se traduz num aumento no QTc de aproximadamente 3,8 ms (IC: 3,0 – 4,6 ms,  $p=7,8 \times 10^{-20}$ ) [25], seguido do genótipo TT (38,3% expectável [48] – 38,0% analisado), identificado como a situação clínica definida como normal, sem aumento do QTc e por último, o genótipo GG (21,5% expectável [48] – 18,0% analisado), que confere ao portador uma tendência para um aumento no QTc de 9,3 ms (IC: 8,5 – 10,1 ms,  $p=5,7 \times 10^{-5}$ ) [52].

A comparação dos resultados obtidos com os expectados é realizada utilizando o teste Qui-quadrado, tal como demonstrado na figura 5 e na tabela IX. Dessa comparação resulta uma significância positiva ( $p=0,79$ ), o que confirma a possibilidade de relacionar os resultados obtidos com os expectados para a população ibérica.

Na análise dos resultados do estudo de Roterdão, realizado entre os anos de 1990 e 1993, em 10275 indivíduos da população de Ommoord (distrito da cidade de Roterdão, Holanda), foi obtida uma frequência para o genótipo TG de 45,5%, do genótipo TT de 40,8% e, para o genótipo GG de 13,7% [19,20,25]. Estes resultados foram obtidos de uma população que, de acordo com os registos existentes, era composta em 96,5% por indivíduos caucasianos [44], idêntica em termos de afinidade populacional à população deste estudo. A análise comparativa dos resultados do estudo de Roterdão com os do presente estudo, feita através do teste Qui-quadrado observável na tabela XVII e na figura 21, resulta uma significância de 0,67, fundamentando uma correlação entre os resultados dos dois estudos.

**Tabela XVII.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).

<b>Genótipo</b>	<b>Normal (TT)</b>	<b>Borderline (TG)</b>	<b>Longo (GG)</b>
<b>% Estudo Norte de Portugal</b>	38,00	44,00	18,00
<b>% Estudo Roterdão</b>	40,80	45,50	13,70
<b>Estatística de teste</b>	0,80		
<b>Graus de liberdade</b>	2,00		
<b>Significância</b>	0,67		



**Figura 21.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10494366, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).

Os resultados do estudo realizado na população Amish americana, em 2007, incidiram na associação do QTc com o gene NOS1AP. Foi obtida uma frequência para o genótipo TG de 45,0%, o que vai de encontro ao valor de 44,0% obtido no presente estudo. No entanto, apesar de terem apresentado resultados muito aproximados à população do Norte de Portugal, estes dados não são comparáveis, uma vez que são provenientes do estudo de duas populações distintas, com diferentes características e frequências genéticas, uma vez que a população Amish apresenta uma elevada consanguinidade [26].

No estudo efetuado por Crotti em 2009, que incidiu sobre a população sul-africana com SQT, foi obtida para o polimorfismo rs10494366 uma frequência do genótipo TG de 32,0% [22]. A população sul-africana utilizada no estudo apresenta

frequências genéticas diferentes da população caucasiana portuguesa que participou neste estudo, não sendo possível a sua correlação.

Em 2010, realizou-se um estudo numa amostra de população americana com SQTL, em que se obteve, para o polimorfismo rs10494366, uma frequência geral do genótipo TG de 45,0% [24]. Estes dados não são, também, todavia, correlacionáveis com os obtidos no presente estudo, uma vez que resultam da junção de resultados de indivíduos de vários grupos étnicos.

Num estudo realizado por Arking, em 2009 nos EUA, incidindo nas maiorias étnicas dos EUA, foi obtida para o polimorfismo rs10494366 uma frequência do genótipo TG de 36,0% na população caucasiana [28].

Num estudo holandês realizado por Kolder, em 2015, que incidiu na análise de modificadores genéticos em pacientes com SQTL, foi obtida para o polimorfismo rs10494366, uma frequência geral do genótipo TG de 43,0% [42].

Os dois estudos supracitados detêm resultados aproximados e populações idênticas à população do presente trabalho (44,0%) pelo que é possível estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos.

### **5.2.2. Polimorfismo rs10918594**

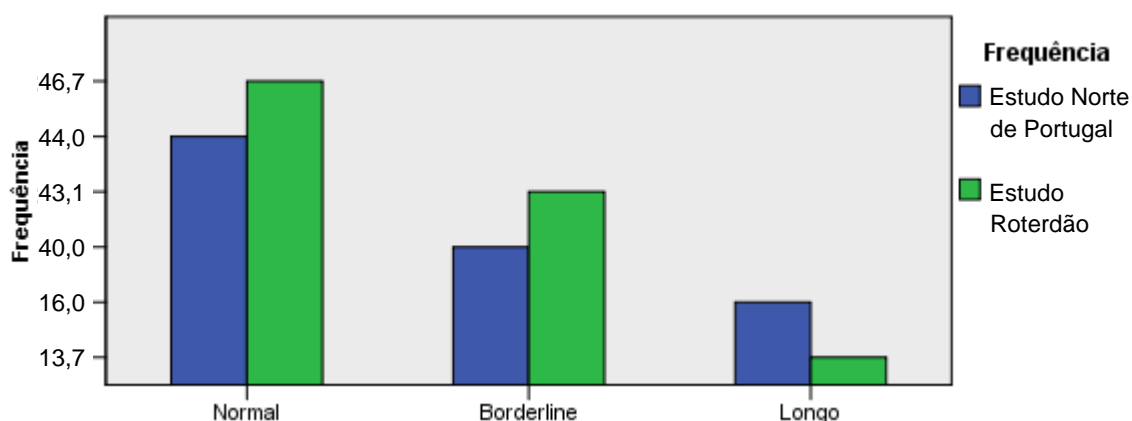
Nos resultados do polimorfismo rs10918594 presentes na tabela X, constata-se que a maior frequência é a do genótipo CC (40,2% expectável [49] – 44,0% analisado), este não induz no indivíduo qualquer aumento no QTc. O segundo mais frequente é o genótipo CG (39,3% expectável [49] – 40,0% analisado), que se traduz num QTc, em média superior a 3,6 ms (IC: 2,7 – 4,4 ms,  $p=6,9 \times 10^{-17}$ ) [25]. Por último, segue-se o genótipo GG (20,6% expectável [49] – 16,0% analisado) que aporta um aumento no QTc de 12,5 ms (IC: 11,6 - 13,4 ms,  $p=1,5 \times 10^{-6}$ ) [52].

Da comparação dos valores obtidos com os valores de referência para a população caucasiana ibérica, realizada através de um teste Qui-quadrado, observável na figura 9 e na tabela XI, resulta uma significância positiva ( $p=0,71$ ), confirmando desse modo a concordância dos valores obtidos com os expectados na população ibérica.

Nos resultados do estudo de Roterdão obteve-se, para o polimorfismo rs10918594, uma frequência do genótipo CC de 46,7%, do genótipo CG de 43,1% e, para o genótipo GG de 13,7% [19,25]. Da comparação com os resultados do estudo de Roterdão com os do presente estudo, pelo teste Qui-quadrado representado na tabela XVIII e na figura 22, resulta uma significância de 0,85, pelo que não se registam diferenças significativas, correlacionando ambos os estudos.

**Tabela XVIII.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).

Genótipo	Normal (CC)	<i>Borderline</i> (CG)	Longo (GG)
% Estudo Norte de Portugal	44,00	40,00	16,00
% Estudo Roterdão	46,70	43,10	13,70
Estatística de teste	0,34		
Graus de liberdade	2		
Significância	0,85		



**Figura 22.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo de Roterdão (1990).

No estudo realizado por Nolte, em 2009, foram utilizados os dados de populações inglesas já estudadas em investigações prévias e teve como principal objetivo verificar a associação entre variações genéticas e a repolarização cardíaca

na população inglesa. Foi obtida para o polimorfismo rs10918594 uma frequência geral do genótipo TG de 25,5% [43]. Estes dados não devem ser comparados com os obtidos no presente estudo, uma vez que resultam da análise de resultados de vários grupos étnicos com diferentes características genotípicas.

### 5.2.3. Polimorfismo rs12143842

Em relação aos resultados do polimorfismo rs12143842, observáveis na tabela XII, verifica-se que a maior frequência é a do genótipo CC (54,9% expectável [50] – 58,0% analisado), correspondente à situação clínica definida como normal, sem que haja aumento do QTc, seguido do genótipo CT (38,8% expectável [50] – 36,0% analisado), correspondente à situação clínica de *borderline*, com aumento do QTc em 4,4 ms (IC: 3,6 – 5,2 ms,  $p=4,4 \times 10^{-28}$ ) [40] e, por fim, o genótipo TT (6,4% expectável [50] – 6,0% analisado), que confere ao portador um aumento do QTc em 8,8 ms (IC: 8,0 – 9,6,  $p=4,1 \times 10^{-25}$ ) [40].

Posteriormente, os resultados são confirmados num teste Qui-Quadrado, tal como demonstrado na figura 13 e na tabela XIII, para se aferir sobre a sua concordância. Daí resulta uma significância positiva ( $p=0,90$ ), confirmando também neste caso a concordância entre os resultados obtidos e expectados para a população de referência.

No estudo que relaciona o QTc com a morte súbita (QTSCD), foram analisadas populações de diversos estudos (ARIC, KORA, SardiNIA, GenNOVA e HNR), totalizando 15842 indivíduos com ancestralidade Europeia. Foi obtida para o polimorfismo rs12143842, uma frequência geral do genótipo CT de 24,0% [46].

No estudo que relaciona o QTc com a variabilidade genética (QTGEN), através da análise dos meta-dados de 13685 indivíduos de ancestralidade Europeia, presentes em 3 estudos (Roterdão, Framingham Heart Study e Cardiovascular Health Study), foi obtida para o polimorfismo rs12143842, uma frequência geral do genótipo CT de 28,6% [46].

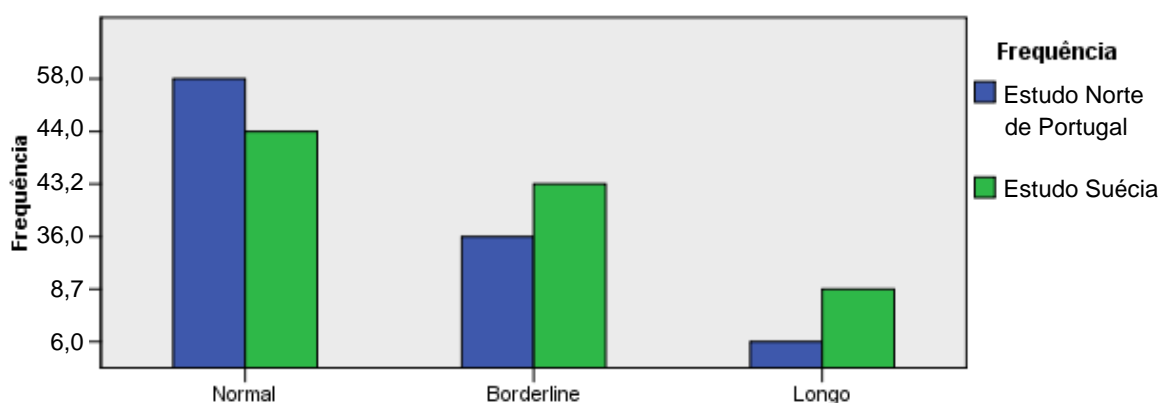
Num estudo holandês realizado por Kolder, em 2015, que incidiu na análise de modificadores genéticos em pacientes com SQT, foi obtida, para o polimorfismo rs12143842, uma frequência geral do genótipo CT de 31,0% [42].

Na comparação dos resultados desses dois estudos (24,0%, 28,6% e 31,0%) com os do presente estudo (40,0%), resulta uma diferença acentuada nas frequências do genótipo CT do polimorfismo rs12143842, pelo que os estudos não apresentam uma concordância.

Em 2017, no artigo de pesquisa que incidiu sobre o estudo efetuado em duas populações da Suécia com SQT, foi obtida, para o polimorfismo rs12143842, uma frequência do genótipo CC de 48,1%, do genótipo CT de 43,2% e, para o genótipo TT a frequência de 8,7% [54]. Em comparação com os resultados do presente estudo, pelo teste Qui-quadrado observável na tabela XIX e na figura 23, resulta uma significância de 0,36, pelo que não se registam diferenças significativas, correlacionando ambos os estudos.

**Tabela XIX.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs12143842, comparando os resultados do presente estudo com o estudo realizado na Suécia (2017).

Genótipo	Normal (CC)	Borderline (CT)	Longo (TT)
% Estudo Norte de Portugal	58,00	36,00	6,00
% Estudo Suécia	48,10	43,20	8,70
Estatística de teste	2,04		
Graus de liberdade	2,00		
Significância	0,36		



**Figura 23.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs10918594, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo realizado na Suécia (2017).



## 5.2.4. Polimorfismo rs16847548

Na análise da tabela XIV verifica-se uma maior frequência do genótipo TT (57,9% expectável [51] – 56,0% analisado), que não induz no indivíduo qualquer aumento do QTc, seguido do genótipo TC (31,8% expectável [51] – 32,0% analisado), que se traduz num aumento no QTc de 8,0 ms (IC: 7,0 – 8,0 ms,  $p=9,0 \times 10^{-3}$ ) [24], seguido pelo genótipo CC (10,3% expectável [51] – 12,0% analisado) [22,24,27].

Da comparação dos valores obtidos com os valores de referência para a população caucasiana ibérica, executada pelo teste Qui-quadrado, observável na figura 17 e na tabela XV, resulta uma significância positiva ( $p=0.92$ ), confirmando desse modo a concordância dos valores obtidos com os expectados na população estudada.

No estudo realizado por Arking nos EUA, em 2009, incidindo nas maiorias étnicas dos EUA, foi obtida para o polimorfismo rs16847548 uma frequência do genótipo TC de 20,0% na população caucasiana [28]. Esta investigação detém populações com características diferentes à população do presente trabalho, pelo que, os resultados obtidos em ambos os estudos não são relacionáveis.

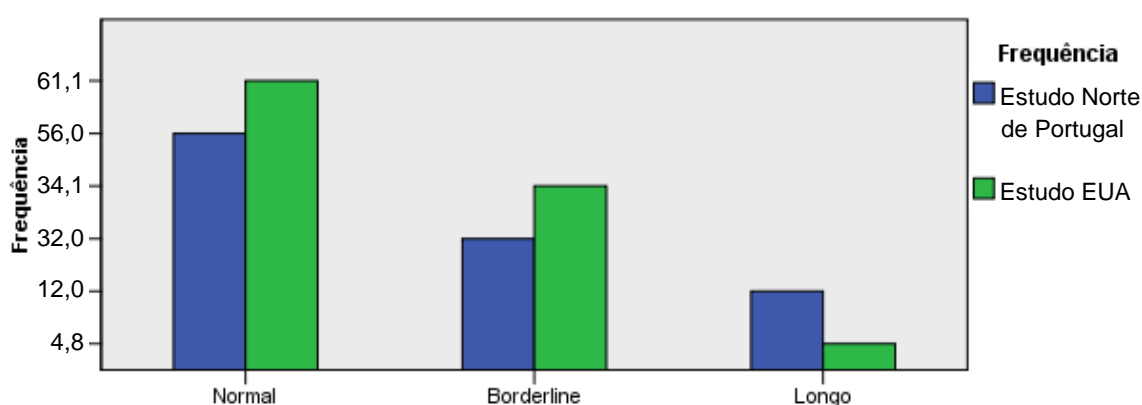
Utilizando amostras de uma população com indivíduos com SQT, foi realizado um estudo em 2010, onde foi obtida para o polimorfismo rs16847548 uma frequência geral do genótipo TC de 29,0% [24]. Estes dados não são, no entanto, correlacionáveis com os obtidos no presente trabalho, uma vez que resultam da junção de resultados provenientes de indivíduos de vários grupos étnicos que detêm diferentes frequências genotípicas da população envolvida neste trabalho.

No estudo realizado por Kao nos EUA, em 2016, sobre a associação de variantes do gene NOS1AP e a MSC foi obtida para o polimorfismo rs16847548, numa amostra de 14292 indivíduos da população caucasiana, uma frequência do genótipo TT de 61,1%, do genótipo TC de 34,2% e, para o genótipo CC de 4,8% [27].

Na comparação destes resultados com os obtidos no presente trabalho, resulta, pelo teste Qui-quadrado observável na tabela XX e na figura 24, uma significância de 0,06, estabelecendo uma correlação entre os estudos.

**Tabela XX.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo dos EUA (2016).

Genótipo	Normal (TT)	Borderline (TC)	Longo (CC)
% Estudo Norte de Portugal	56,00	32,00	12,00
% Estudo EUA	61,10	34,10	4,80
Estatística de teste	5,69		
Graus de liberdade	2		
Significância	0,06		



**Figura 24.** Teste Qui-quadrado para o polimorfismo rs16847548, comparando os resultados do presente estudo com os do estudo dos EUA (2016).

### 5.3. Análise dos polimorfismos e categorização do risco de apresentar SQTl

Por forma a interpretar os resultados obtidos para os quatro polimorfismos estudados, deve ser criada uma estrutura de classificação que atribui pontos consoante a categoria de aumento do QTc num determinado indivíduo. Assim os indivíduos categorizam-se da seguinte forma:

- Quando o indivíduo apresentar um polimorfismo com genótipos que em nada alteram o QTc, estamos perante a situação clínica definida como “normal”, que é pontuada com 0 pontos;

- Se o indivíduo apresentar o polimorfismo que confere um pequeno aumento do QTc, correspondente à situação de heterozigotia, a categoria respeitante é denominada de *borderline*, e é atribuída a pontuação de 1 ponto.
- Se o indivíduo for portador do polimorfismo que representa maior risco de aumento significativo do QTc, é-lhe atribuído 3 pontos.

Realizada a soma das pontuações para cada indivíduo, são constituídos quatro grupos de gravidade crescente:

- Grupo I: 0 a 2 pontos. O indivíduo não apresenta risco de desenvolver QT Longo;
- Grupo II: 3 a 5 pontos. O indivíduo apresenta um baixo risco de desenvolver QT Longo;
- Grupo IIIa: 6 a 8 pontos. O indivíduo apresenta risco de desenvolver QT Longo;
- Grupo IIIb: 9 a 12 pontos. O indivíduo apresenta risco elevado de desenvolver QT Longo.

Na tabela XVI podemos observar a aplicação deste sistema de pontuações, sendo que em 27 casos, correspondentes a 54% da população total, não apresenta qualquer risco de desenvolver um aumento do QTc.

Identificam-se 13 casos, correspondentes a 26,0% da população em estudo como tendo um baixo risco de ter QT Longo.

Em 5 casos, existe o risco de apresentar QT Longo e, 5 casos apresentam um risco elevado de terem a patologia associada. Estes dois últimos grupos correspondem a 20,0% da população total estudada. Face a estes dados fica evidente que o diagnóstico da patologia de QT Longo deve ser continuado através da análise de eletrocardiogramas a indivíduos pertencentes aos grupos IIIa e IIIb.

Relativamente à SQTL, sabe-se que o aumento da QTc é um fator de risco para MSC, constituindo um preditor independente de episódios arrítmicos, sobretudo de taquiarritmias ventriculares polimórficas do tipo *torsades de pointes* e síncope quando o intervalo entre a onda Q e T é superior ao normal em mais de 3 ms [18-21].

## **6. Conclusões**



As conclusões deste trabalho são:

1. Verificou-se para os quatro polimorfismos estudados do gene NOS1AP, uma correlação significativa com os resultados obtidos em estudos anteriores.
2. Os valores de frequência dos genótipos obtidos no presente estudo estão concordantes com os valores de estudos anteriores e com os valores de referência para a população estudada, pelo que foi pertinente analisar a população do estudo, por forma a estabelecer um mapeamento desses SNP no Norte de Portugal.
3. Da avaliação do gene NOS1AP foram identificados todos os possíveis genótipos descritos dos SNP rs10494366, rs10918594, rs12143842 e rs16847548.
4. A identificação dos SNP analisados não só confirma a robustez dos resultados obtidos nesta investigação, mas também indica que a avaliação destes SNP é uma forma eficaz de despistar a presença de SQTl num indivíduo, uma vez que induzem maiores aumentos no valor do QTc.

Este trabalho poderá servir como estrutura inicial de uma investigação complementar, com despiste através da observação de eletrocardiogramas, por forma a confirmar o valor QT como efetivamente aumentado. Posteriormente, a avaliação das situações de risco encontradas deverão ser procedidas do encaminhamento do jovem para a consulta de Medicina Geral e Familiar, de forma a ser monitorizada a sua situação cardíaca para a presença da SQTl.

# **Referências Bibliográficas**



- [1] Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, Gouveia RH, Sheppard M, Thiene G, Wal A. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch* 452: 11-18, 2008.
- [2] Farrugia A, Keyser C, Hollard C, Raul JS, Muller J, Ludes B. Targeted next generation sequencing application in cardiac channelopathies: Analysis of a cohort of autopsy-negative sudden unexplained deaths. *Forensic Science International* 254: 5-11, 2005.
- [3] PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares - Doenças Cérebro-Cardiovasculares em números. *Direção-Geral da Saúde*, 2015. ISSN 2183-0681
- [4] Rodríguez-Calvo MS, Brion M, Allegue C, Concheiro L, Carracedo A. Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic Science International* 182: 1-12, 2008.
- [5] Campuzano O, Álvarez PB, Iglesias A, Scornik F, Pérez G, Brugada R. Genetics and cardiac channelopathies. *Genetics in Medicine* 12: 260-267, 2010.
- [6] Baliga RR, Young JB. Editorial: Sudden death in heart failure: na ounce of prediction is worth a pound of prevention. *Heart Failure Clinics* 7: 13-18, 2011.
- [7] de la Grandmaison GL. Is there progress in the autopsy diagnosis of sudden unexpected death in adults? *Forensic Science International* 156: 138-144, 2006.
- [8] Tester DJ, Ackerman MJ. The molecular autopsy: should the evaluation continue after the funeral? *Pediatr Cardiol* 33: 461-470, 2012.
- [9] Campuzano O, Brugada GS, Soler IM, Allegue C, Cesar S, Costa CF, Coll M, Mates J, Brugada R. Identification of Genetic Alterations, as Causative Genetic Defects in Long QT Syndrome, Using Next Generation Sequencing Technology. *PLoS One* 9: 1-12 2014.
- [10] Crouch MA, LL Limon, Cassano AT. Clinical relevance and management of drugrelated QT interval prolongation. *Pharmacotherapy* 23: 881-908, 2003.
- [11] Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A, De Ponti F. QT prolongation through hERG K(+) channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Ver* 25: 133-66, 2005.
- [12] Zumhagen S, Stallmeyer B, Friedrich C, Eckardt L, Seebolhm G, Schulze-Bahr E. Inherited long QT syndrome: clinical manifestation, genetic diagnostics, and therapy. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 23: 211-219, 2012.
- [13] Crotti L, Celano G, Dagradi F, Schwartz PJ. Congenital Long QT-Syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3: 1-16, 2008.
- [14] Aziz EF, Javed F, Pratap B, Herzog E. Strategies for the prevention and treatment of sudden cardiac death. *Open Access Emergency Medicine* 2:99-114, 2010.
- [15] Baars, HF, Heijden JF. Congenital long QT syndrome. *Clinical Cardiogenetics* 9: 143-164, 2011.

- [16] Bille K, Figueiras D, Schamasch P, Kappenberger L, Brenner JI, Meijboom FJ, Meijboom EJ. Sudden cardiac death in athletes: the Lausanne Recommendations. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 13: 859-875, 2006.
- [17] Corrado D, Pelliccia A, Heibuchel H, Sharma S, Link M, Basso C, Biffi A, Buja G, Delise P, et al. Recommendations for interpretation of 12-lead electrocardiogram in the athlete. *European heart jornal* 31: 243-259, 2010.
- [18] Jamshidi Y, Nolte IM, Dalageorgou C, Zheng D, Johnson T, Bastiaenen R, Ruddy S, Talbott D, Norris KJ, et al. Common Variation in the NOS1AP gene is associated with drug-induced QT prolongation and ventricular arrhythmia. *Journal of the American College of Cardiology* 60: 841-850, 2012.
- [19] van Noord C, Aarnoudse AJ, Eijgelsheim M, Sturkenboom MC, Straus SM, Hofman A, Kors JA, Newton-Cheh C, Witteman JC, Stricker BH. Calcium channel blockers, NOS1AP, and heart-rate-corrected QT prolongation. *Pharmacogenet Genomics* 19: 260-266, 2009.
- [20] Becker ML, Visser LE, Newton-Cheh C, Hofman A, Uitterlinden AG, Witteman JC, Stricker BH. A common NOS1AP genetic polymorphism is associated with increased cardiovascular mortality in users of dihydropyridine calcium channel blockers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 67: 61-67, 2009.
- [21] Kapoor A, Sekar RB, Hansen NF, Fox-Talbot K, Morley M, Pihur V, Chatterjee S, Brandimarto J, Moravec CS, Pulit SL, et al. An enhancer polymorphism at the cardiomyocyte intercalated disc protein NOS1AP locus is a major regulator of the QT interval. *The American Society of Human Genetics* 94: 854-869, 2014.
- [22] Crotti L, Monti MC, Insolia R, Peljto A, Goosen A, Brink PA, Greenberg DA, Schwartz PJ, George AL. NOS1AP is a genetic modifier of the long-QT syndrome. *Circulation* 120:1657-1663, 2009.
- [23] Raitakari OT, Blom-Nyholm J, Koskinen TA, Kähönen M, Viikari JS, Lehtimäki T. Common variation in NOS1AP and KCNH2 genes and QT interval duration in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Annals of Medicine* 41: 144-151, 2009.
- [24] Tomas M, Napolitano C, de Giuli L, Bloise R, Subirana I, Malovini A, Bellazzi R, Arking DE, Marban E, Chakravarti A, et al. Polymorphisms in the NOS1AP gene modulate QT interval duration and risk of arrhythmias in the long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 55: 2745-2752, 2010.
- [25] Aarnoudse AJ, Newton-Cheh C, de Bakker PI, Straus SM, Kors JA, Hofman A, Uitterlinden AG, Witteman JC, Stricker BH. Common NOS1AP variants are associated with a prolonged QTc interval in the Rotterdam Study. *Circulation* 116: 10-16, 2007.



- [26] Post W, Shen H, Damcott C, Arking DE, Kao WH, Sack PA, Ryan KA, Chakravarti A, Mitchell BD, Shuldiner AR. Associations between genetic variants in the NOS1AP (CAPON) gene and cardiac repolarization in the old order Amish. *Human Heredity* 64: 214-219, 2007.
- [27] Kao WH, Arking DE, Post W, Rea TD, Sotoodehnia N, Prineas RJ, Bishe B, Doan BQ, Boerwinkle E, Psaty BM, et al. Genetic variations in nitric oxide synthase1 adaptor protein are associated with sudden cardiac death in US white community-based populations. *Circulation* 119: 940-951, 2009.
- [28] Arking DE, Khera A, Xing C, Kao WH, Post W, Boerwinkle E, Chakravarti A. Multiple independent genetic factors at NOS1AP modulate the QT interval in a multi-ethnic population. *PLoS ONE* 4:e4333, 2009.
- [29] Eijgelsheim M, Newton-Cheh C, Aarnoudse AL, van Noord C, Witteman JC, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Genetic variation in NOS1AP is associated with sudden cardiac death: evidence from the Rotterdam Study. *Human Molecular Genetics* 18: 4213–4218, 2009.
- [30] Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186, 1999.
- [31] Wang, Z, Moulton, J. SNPs, protein structure, and disease. *Human Mutation* 17: 263-270, 2011.
- [32] Carvalho C. Aplicação Médico-Legal da PCR em Tempo Real na Caracterização de SNPs. *Universidade do Porto*, 2007.
- [33] Wang L, Luhm R, Lei M. SNP and mutation analysis. *Adv Exp Med Biol* 593:105-116, 2007.
- [34] Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics* 8:3-7, 2015.
- [35] Shastri BS. SNPs: impacto n gene function and phenotype. *Methods in Molecular Biology* 578:3-22, 2009.
- [36] Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Current issues in molecular biology* 5:43-60, 2003.
- [37] Wang Z, Moulton J. SNPs, protein structure, and disease. *Human Mutation* 17:263-270, 2001.
- [38] Corrado D, Drezner J, Basso C, Pelliccia A, Thiene G. Strategies for the prevention of sudden cardiac death during sports. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 18:197-208, 2011.
- [39] Arking DE, Pfeufer A, Post W, Kao WH, Newton-Cheh C, Ikeda M, West K, Kashuk C, Akyol M, Perz S, Illig T, et al. A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nature genetics* 35: 644-651, 2006.

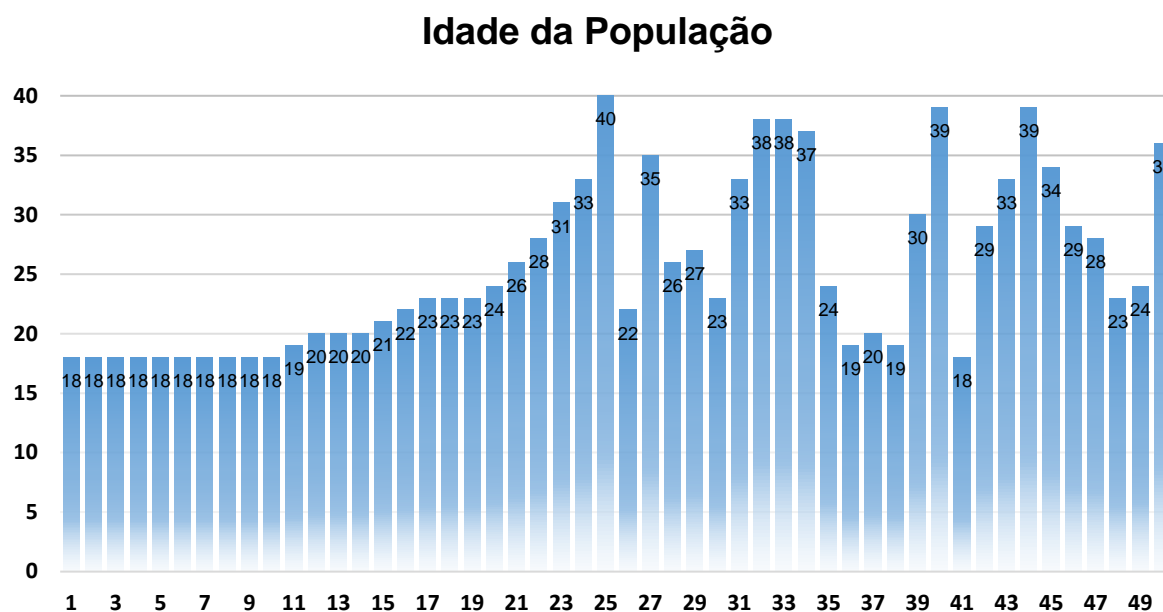
- [40] Eijgelsheim M, Aarnoudse AL, Rivadeneira F, Kors JA, Witteman JC, Hofman A, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Stricker BH. Identification of a common variant at the NOS1AP locus strongly associated to QT-interval duration. *Human molecular genetics* 18: 347-357, 2009.
- [41] Chang KC, Barth AS, Sasano T. CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4477–4482, 2008.
- [42] Kolder IC, Tanck MW, Postema PG, Barc J, Sinner MF, Zumhagen S, Husemann A, Stallmeyer B, Koopmann TT, Hofman N, et al. Analysis for Genetic Modifiers of Disease Severity in Patients with Long-QT Syndrome Type 2. *Circulation Cardiovascular Genetics* 8:447-456, 2015.
- [43] Nolte IM, Wallace C, Newhouse SJ, Waggott D, Fu J, Soranzo N, Gwilliam R, Deloukas P, Savelieva I, Zheng D, et al. Common Genetic Variation near the Phospholamban gene is associated with Cardiac Repolarisation: Meta-analysis of Three Genome-wide association studies. *PLoS ONE* 4:e6138, 2009.
- [44] HOLANDA. Administração Municipal Básica. Base de Dados - Roterdão em cifras. Versão 2.12, 2017.
- [45] Newton-Cheh C, Eijgelsheim M, Rice K, de Bakker PI, Yin X, Estrada K, Bis J, Marcianti K, Rivandeneira F, Noseworthy PA, et al. Common variants at ten loci influence myocardial repolarization: the QTGEN Consortium. *Nature Genetics* 41:399-406, 2009.
- [46] Pfeufer A, Sanna S, Arking DE, Muller M, Gateva V, Fuchsberger C, Ehret GB, Orrú M, Pattaro C, Kottgen A, et al. Common variants at ten loci modulate duration in the QTSCD Study. *Nature Genetics* 41:407-414, 2009.
- [47] Marroni F, Pfeufer A, Aulchenko YS, Franklin CS, Isaacs A, Pichler I, Wild SH, Oostra BA, Wright AF, Campbell H, et al. A genome-wide association scan of RR and QT interval duration in 3 European genetically isolated populations: the EUROSPAN project. *Circulation Cardiovascular Genetics* 2:322-328, 2009.
- [48] A global reference for human genetic variation, The 1000 Genomes Project. [atualizado a 01 outubro 2015; acesso a 07 fevereiro 2017]. Disponível em: [http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:16208518-5-162086185;v=rs10494366;vdb=variation;vf=6025018](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:16208518-5-162086185;v=rs10494366;vdb=variation;vf=6025018)
- [49] A global reference for human genetic variation, The 1000 Genomes Project. [atualizado a 01 outubro 2015; acesso a 07 fevereiro 2017]. Disponível em: [http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?r=1:162030188-162031188;v=rs10918594;vdb=variation;vf=6303439#population\\_freq\\_EUR](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=1:162030188-162031188;v=rs10918594;vdb=variation;vf=6303439#population_freq_EUR)
- [50] A global reference for human genetic variation, The 1000 Genomes Project. [atualizado a 01 outubro 2015; acesso a 07 fevereiro 2017]. Disponível em:

[http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:162033390-162034390;v=rs12143842;vdb=variation;vf=7326680](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:162033390-162034390;v=rs12143842;vdb=variation;vf=7326680)

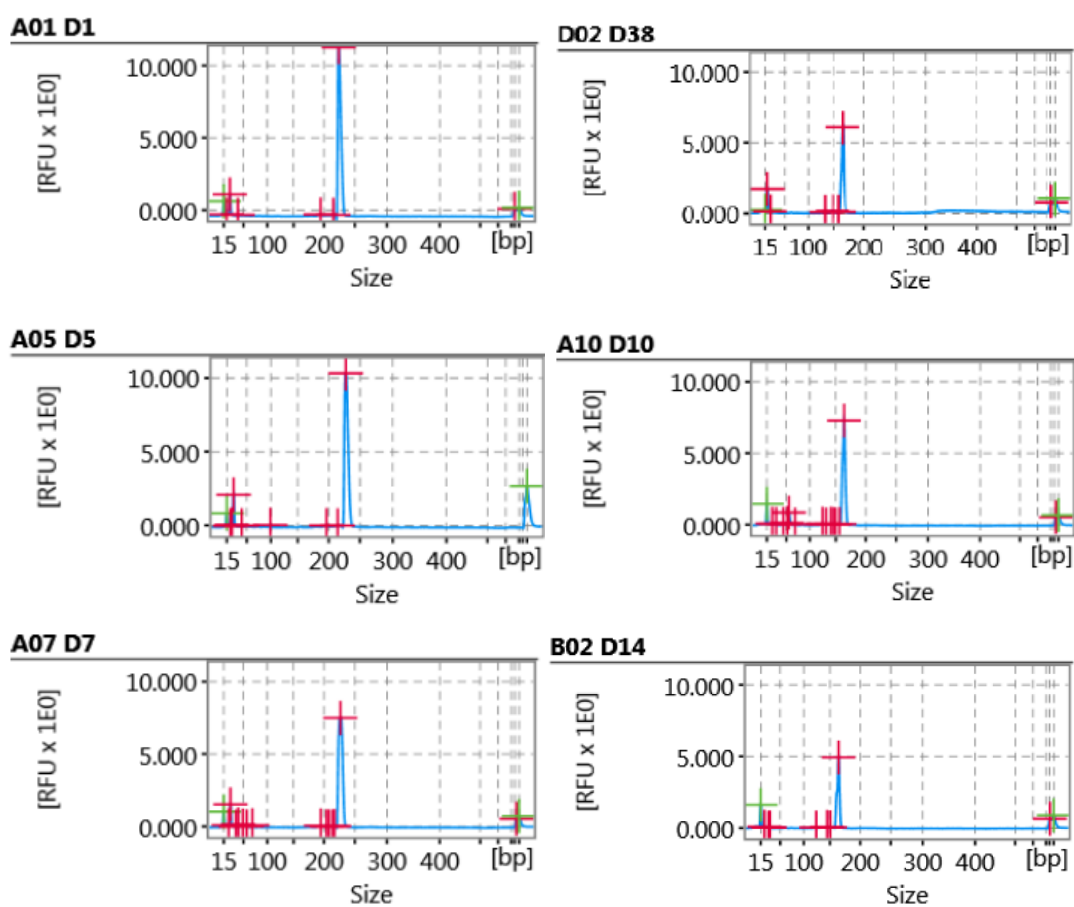
- [51] A global reference for human genetic variation, The 1000 Genomes Project. [atualizado a 01 outubro 2015; acesso a 07 fevereiro 2017]. Disponível em: [http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:162034774-162035774;v=rs16847548;vdb=variation;vf=8438393#373524\\_tablePanel](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:162034774-162035774;v=rs16847548;vdb=variation;vf=8438393#373524_tablePanel)
- [52] Lehtinen AB, Newton-Cheh C, Ziegler JT, Langefeld CD, Freedman BI, Daniel KR, Herrington DM, Bowden DW. Association of NOS1AP genetic variants with QT interval duration in families from the Diabetes Heart Study. *American Diabetes Association* 57:1108-1114, 2008.
- [53] Booth CS, Piennar E, Termaat JR, Whitney SE, Louw TM, Viljoen HJ. Efficiency of the Polymerase Chain Reaction. *Chemical Engineering Science* 65:4996-5006, 2010.
- [54] Winbo A, Stattin EL, Westin IM, Norberg A, Persson J, Jensen SM, Rydberg A. Sex is a moderator of the association between NOS1AP sequence variants and QTc in two long QT syndrome founder populations: a pedigree-based measured genotype association analysis. *BMC Medical Genetics* 18:74-83, 2017.

## **7. Anexos**

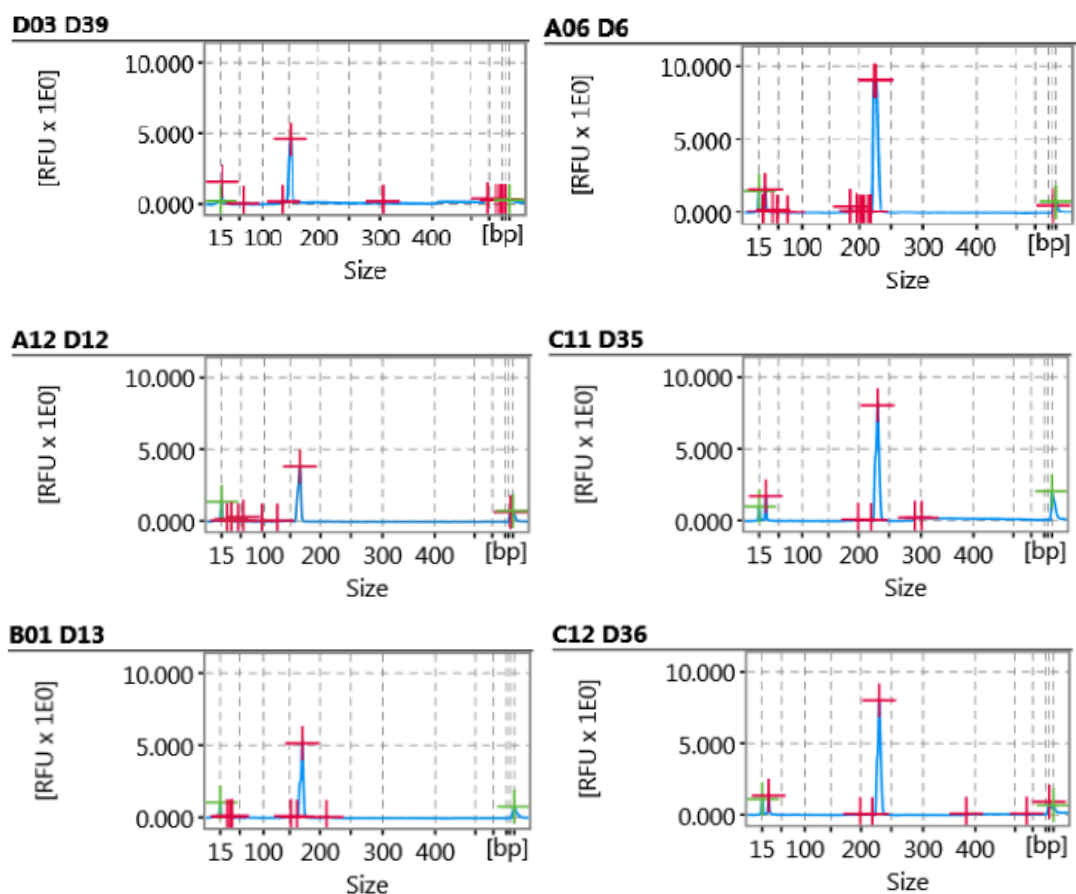




**Figura 25.** Distribuição da amostra total pelas idades dos voluntários aquando da entrada no estudo.



**Figura 26a.** Eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) da PCR *singleplex* utilizada para as regiões-alvo amplificadas - I.



**Figura 26b.** Eletroforese capilar automatizada (sistema QIAxcel) da PCR *singleplex* utilizada para as regiões-alvo amplificadas - II.

Project: NOS1AP

Summary

NT Variants

Index

Reference

Reference-AA

```

1  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
2  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
3  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
4  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
5  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
6  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
7  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
8  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
9  ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
10 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
11 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
12 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
13 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
14 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
15 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
16 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
17 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
18 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
19 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
20 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
21 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
22 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
23 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
24 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
25 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
26 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
27 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
28 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
29 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
30 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
31 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
32 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
33 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
34 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
35 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
36 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
37 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
38 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
39 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
40 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
41 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
42 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
43 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
44 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
45 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
46 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
47 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
48 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
49 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.
50 ATCAGATATTTATGGGAGGTTATGCAGKTTTAAATTCTGAGAATTTGT.

```

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

SeqScape Software 3

**Figura 27.** Alinhamento das sequências obtidas para o polimorfismo rs10494366 no programa SeqScape Software V3.0.







Project: NOS1AP

Summary

NT Variants

Index

Reference

Reference-AA

		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
		.....391.....401.....411.....421.....431
		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
		P G S H P S S K I S H C V Q S S
1		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
2		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
3		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
4		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
5		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
6		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
7		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
8		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
9		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
10		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
11		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
12		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
13		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
14		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
15		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
16		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
17		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
18		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
19		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
20		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
21		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
22		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
23		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
24		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
25		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
26		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
27		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
28		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
29		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
30		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
31		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
32		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
33		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
34		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
35		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
36		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
37		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
38		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
39		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
40		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
41		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
42		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
43		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
44		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
45		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
46		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
47		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
48		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
49		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT
50		CCAGGGTTCACATCCCAGTTTAAAAAATATCCCATGGAGTGCAGTCATCT

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

SeqScape Software 3

**Figura 29.** Alinhamento das sequências obtidas para o polimorfismo rs12143842 no programa SeqScape Software V3.0.


Reference-AA

50

SeqScape Software 3

75

CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE



**SÃO JOÃO**

**PARA INVESTIGAÇÃO CLÍNICA**

Considerando a "Declaração de Helsínquia" da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996; Edimburgo 2000; Seoul 2008; Fortaleza 2013)

**Designação do Estudo** (em português)

Genotipagem do gene NOS1AP e risco cardiovascular.  
Estudo de uma população do Norte de Portugal.

*Confirmo que expliquei ao participante/representante legal, de forma adequada e compreensível, a investigação referida, os benefícios, os riscos e possíveis complicações associadas à sua realização.*

Informação escrita em anexo: ☐ Não ☒ Sim (Nº de páginas 1 )

**O Investigador responsável**

Nome: Daniel Filipe Conceição Sousa \_\_\_\_\_  
legível assinatura

**Identificação do participante**

Nome: \_\_\_\_\_

BI/ CC nº: \_\_\_\_\_

**Participante/ Representante legal**

- Compreendi a explicação que me foi facultada acerca do estudo que se tenciona realizar: os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto.
- Solicitei todas as informações de que necessitei, sabendo que o esclarecimento é fundamental para uma boa decisão.
- Fui informado da possibilidade de livremente recusar ou abandonar a todo o tempo a participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na assistência que é prestada.
- Declaro não ter sido incluído em nenhum outro projeto de investigação nos últimos três meses.

*Concordo com a participação neste estudo, de acordo com os esclarecimentos que me foram prestados, como consta neste documento, do qual me foi entregue uma cópia.*

Data:     /     /     \_\_\_\_\_  
assinatura

Nome (Pais/Representante legal): \_\_\_\_\_

BI/ CC nº: \_\_\_\_\_ Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Data:     /     /     \_\_\_\_\_  
assinatura

N.º CES-IM004-0

**Figura 31.** Modelo de consentimento informado, esclarecido e livre para a inclusão de indivíduos no presente estudo.